



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0035154

(51)⁷ C12N 1/20; C12N 9/12

(13) B

(21) 1-2014-03931

(22) 25/04/2013

(86) PCT/EP2013/058655 25/04/2013

(87) WO2013/160413 31/10/2013

(30) 12165517.9 25/04/2012 EP; 12198766.3 20/12/2012 EP

(45) 25/04/2023 421

(43) 25/06/2015 327A

(73) CHR. HANSEN A/S (DK)

Boege. Alle 10-12, DK-2970 Hoersholm, Denmark

(72) JOHANSEN, Eric (CA); SOERENSEN, Kim Ib (DK); CURIC-BAWDEN, Mirjana (US); JUNGE, Mette Pia (DK).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) CHỪNG VI KHUẨN AXIT LACTIC, PHƯƠNG PHÁP SÀNG LỌC VÀ PHÂN LẬP, CHẾ PHẨM CHỨA CHÚNG, VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT SẢN PHẨM SỮA LÊN MEN

(57) Công nghiệp sản xuất sữa ngày nay gặp phải vấn đề là tạo ra phương pháp thay thế cho việc phải bổ sung chất làm ngọt vào sản phẩm sữa được lên men để có được vị ngọt mong muốn mà không tăng lượng calo. Ngoài ra, sẽ là rất ưu điểm nếu tìm ra phương pháp làm giảm lượng lactoza ở các sản phẩm sữa được lên men đến mức chấp nhận được với người tiêu thụ không dung nạp lactoza. Các vấn đề nêu trên được giải quyết bằng cách tạo ra các chủng *Streptococcus thermophilus* đột biến và các chủng đột biến *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* mà tiết glucoza vào sữa khi sữa khi được cấy và tiến hành lên men bằng các chủng *Streptococcus thermophilus* và các chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* như vậy. Do đó, sáng chế đề cập đến các chủng *Streptococcus thermophilus* mang đột biến trong trình tự ADN của gen *glcK* mã hóa protein glucokinaza và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* có tính kháng 2-đeoxyglucoza mà tiết glucoza vào cơ chất sữa trong quá trình lên men. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp sàng lọc và phân lập các chủng này, chế phẩm chứa chúng dùng để sản xuất sản phẩm sữa lên men và sản phẩm thu được.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các chủng vi khuẩn và nuôi cấy *Streptococcus thermophilus* có đặc tính tạo vị ngọt nhờ có sự tiết lượng glucoza cao do làm giảm lactoza, các chủng vi khuẩn *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* có đặc tính tạo vị ngọt nhờ có sự tiết lượng cao glucoza gây ra do sự giảm lactoza, giống khởi động chứa các chủng như vậy, và các sản phẩm sữa được lên men bằng nuôi cấy này. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp thu nhận các chủng như vậy và việc sử dụng các chủng như vậy để tạo ra các sản phẩm sữa được lên men và để làm tăng độ ngọt của các sản phẩm sữa được lên men đồng thời làm giảm hàm lượng lactoza của sản phẩm sữa được lên men.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các sản phẩm sữa được lên men thuần khiết được nhận biết bởi vị hoa quả hoặc chua do sự chuyển hóa lactoza thành axit lactic bởi vi khuẩn axit lactic trong quá trình lên men. Do đó, các sản phẩm này thường được tạo vị ngọt bằng cách thêm hoa quả, mật ong, đường hoặc chất làm ngọt nhân tạo để đáp ứng nhu cầu khách hàng có sản phẩm với vị ngọt.

Ngành công nghiệp thực phẩm có nhu cầu ngày càng tăng về sản phẩm thực phẩm có vị ngọt ít năng lượng để khắc phục vấn đề thừa cân và béo phì đã trở thành xu thế trong 20 năm gần đây. Độ ngọt, thường được xem là mang lại cảm giác dễ chịu, được tạo ra bởi sự có mặt của các loại đường và một số chất khác. Cảm nhận ngọt của các loại đường là rất khác nhau. Khi dùng sucroza làm đối chứng với độ ngọt 100, thì độ ngọt của lactoza là 16, của galactoza là 32 và glucoza là 74 (Godshall (1988). Food Technology 42(11):71-78). Do đó, glucoza về cảm quan có độ ngọt cao hơn 4 lần lactoza trong khi có lượng calo gần tương đương.

Đường trong sản phẩm thực phẩm lên men ngày càng thường được thay bằng các chất làm ngọt như aspartam, axesulfam K, sucraloza và sacarin là các chất tạo độ ngọt với năng lượng calo hấp thu thấp hơn. Tuy nhiên, việc sử dụng chất làm ngọt nhân tạo có thể làm mất vị sản phẩm và một số nghiên cứu đã cho thấy rằng việc tiêu thụ chất làm ngọt nhân tạo thường có các nhược điểm như làm tăng cảm giác đói, gây dị ứng, ung thư v.v., nên người tiêu thụ có xu hướng dùng các sản phẩm sữa được lên men chỉ chứa chất làm ngọt tự nhiên hoặc, tốt hơn nữa, không bổ sung chất làm ngọt.

Do đó, một thách thức đặc biệt là phát triển các sản phẩm sữa lên men trong đó độ ngọt tự nhiên (nội tại) là cao.

Độ axit của các sản phẩm sữa được lên men phụ thuộc phần nhiều vào vi khuẩn axit lactic có mặt và các thông số quy trình được dùng để chế biến sản phẩm sữa lên men.

Lên men disacarit lactoza được nghiên cứu chính ở vi khuẩn axit lactic vì đây là nguồn cacbon chủ yếu trong sữa. Ở nhiều loại, sau khi hấp thu lactoza được phân cắt bởi α -galactosidaza thành glucoza và galactoza. Ở phần lớn vi khuẩn axit lactic, glucoza được phosphoryl hóa bởi glucokinaza thành glucoza-6-phosphat và được lên men thông qua quá trình Embden-Meyerhof-Parnas (glycol phân) (Fig. 1).

Streptococcus thermophilus là một trong số các vi khuẩn axit lactic được sử dụng rộng rãi nhất để lên men ưa nhiệt sữa trong sản xuất thương mại trong đó vi khuẩn này thường được dùng như là một thành phần của hỗn hợp giống khởi động, thành phần kia là *Lactobacillus* sp., ví dụ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dùng trong sản xuất sữa chua hoặc *Lactobacillus helveticus* dùng trong sản xuất pho mát kiểu Thụy sĩ.

Định nghĩa chính tắc của sữa chua ở nhiều nước yêu cầu có *Streptococcus thermophilus* cùng với *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Cả hai thành phần này tạo ra lượng axetaldehyt mong muốn, là một thành phần hương vị quan trọng trong sữa chua.

Streptococcus thermophilus lên men lactoza và sucroza một cách dễ dàng hơn so với các monosacarit cấu thành chúng. Khi có mặt lượng dư chỉ galactoza thì phần glucoza của phân tử lactoza được lên men và galactoza được tích lũy trong các sản phẩm sữa được lên men khi sử dụng *Streptococcus thermophilus*. Trong sữa chua có nồng độ axit cao làm ức chế quá trình lên men, galactoza tự do vẫn còn trong khi đó galactoza tự do tạo ra ở giai đoạn ban đầu của sản xuất pho mát Thụy sỹ được lên men sau đó bởi *Lactobacillus helveticus*.

Tuy nhiên, các chủng lên men galactoza gồm cả *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* đã được một số nhà nghiên cứu báo cáo (Hutkins *et al.* (1986) J. Dairy Sci. 69(1):1-8; Vaillancourt *et al.* (2002) J. Bacteriol. 184(3); 785-793) và trong WO 2011/026863 (Chr. Hansen) được mô tả là phương pháp thu nhận các chủng *Streptococcus thermophilus* là chủng lên men galactoza.

Để đáp ứng yêu cầu của công nghiệp thực phẩm, sẽ là có lợi nếu tìm ra các chủng mới, đặc biệt là các chủng *Streptococcus thermophilus* và các chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, tạo ra độ ngọt tự nhiên hơn mà không tăng calo trực tiếp cho sản phẩm được lên men (độ ngọt bên trong) nhờ có sự tiết glucoza.

Pool *et al.* (2006. Metabolic Engineering 8(5); 456-464) bộc lộ chủng *Lactococcus lactis* trong đó sự trao đổi chất glucoza bị phá hủy hoàn toàn do làm khuyết các gen mã hóa glucokinaza, EII(man/glc) và glucoza-PTS EII(cel) mới được phát hiện. Phương pháp cấu trúc này là tái tổ hợp di truyền để tạo ra tất cả các đột biến và chủng thu được là sinh vật biến đổi di truyền (GMO: genetically cải biến organism) mà hiện nay không được sử dụng trong sản phẩm thực phẩm.

Thompson *et al.* (1985. J Bacteriol. 162(1); 217-223) đã nghiên cứu cơ chế lactoza ở *Streptococcus lactis* (ngày nay được đặt tên lại là *Lactococcus lactis*). Trong công trình nghiên cứu này 2-deoxyglucoza được sử dụng để thu được chủng đột biến trong hệ thống manosa-PTS. Sau đó, chủng đột biến này được gây đột biến bằng cách sử dụng gây đột biến gen bằng UV sau đó sàng lọc các khuẩn lạc âm tính glucoza bằng cách kỹ thuật đóng dấu (replica plating). Theo cách này phân lập được chủng đột biến kép (manosa PTS và glucokinaza). Chủng đột biến kép này được sử dụng để nghiên

cứu cơ chế liên quan đến quá trình điều hòa lên men lactoza bởi vi sinh vật "giống ban đầu". Các chủng đột biến này có một số ưu điểm so với chủng gốc của chúng nên trở thành không thích hợp để đưa vào giống khởi động thương mại. Hiệu suất tế bào của các chủng đột biến này chỉ bằng nửa chủng gốc tính theo mol lactoza được lên men và thời gian nhân đôi tăng lên đáng kể ở chủng đột biến khi cho phát triển trên lactoza. Tương tự, hiệu suất axit lactic chỉ bằng một nửa hiệu suất của chủng gốc trên mol lactoza được lên men. Đặc tính của các chủng này trong sữa không được phân tích nhưng cho là mức axit hóa bị giảm đáng kể.

Ngoài ra, *Lactococcus lactis* thường không được lựa chọn để sản xuất axetaldehyt và không đáp ứng yêu cầu của định nghĩa luật định về sữa chua.

Chervaux et al. (2000. Appl. And Environ. Microbiol., 66, 5306-5311), nghiên cứu đặc tính sinh lý các chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* trong môi trường có thành phần hoá học nhất định mới và phân lập được các chủng đột biến có tính kháng 2-deoxyglucoza thiếu hụt quá trình lên men glucoza. Nhận thấy có một số kiểu hình khác nhau và có báo cáo ảnh hưởng đặc hiệu chủng.

Không có nghiên cứu nào trong số các nghiên cứu nêu trên giải quyết vấn đề là tạo ra các chủng *Streptococcus thermophilus* và các chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* có đặc tính làm tăng độ ngọt tự nhiên của sản phẩm thực phẩm được lên men bằng cách sử dụng các chủng như vậy đơn lẻ hoặc cùng với các chủng vi khuẩn axit lactic khác.

Ngoài ra, không có nghiên cứu nào trong số các nghiên cứu nêu trên giải quyết vấn đề là làm giảm hàm lượng lactoza trong sản phẩm thực phẩm mà được lên men bằng cách sử dụng các chủng như vậy đến mức dung nạp được với những người không dung nạp lactoza.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Ngược lại với tình trạng kỹ thuật nêu trên, các tác giả sáng chế đã phát hiện thấy rằng có thể chọn lọc được các chủng *Streptococcus thermophilus* có đột biến ở gen glucokinaza (*glcK*) bằng cách cho các chủng *Streptococcus thermophilus* lên men

galactoza tiếp cận với 2-đeoxyglucoza và khi được nuôi trên cơ chất sữa các tế bào này tiêu hóa lactoza và galactoza và tiết glucoza vào môi trường.

Điều bất ngờ là các chủng *Streptococcus thermophilus* đơn lẻ này vẫn có đủ khả năng axit hóa sữa mặc dù thời gian axit hóa đến độ pH 5 bị chậm 2-5 giờ. Do đó, các chủng như vậy là hữu ích trong các ứng dụng sữa lên men.

Tuy nhiên, glucoza được sử dụng làm nguồn cacbon cho nhiều vi khuẩn axit lactic và glucoza được tiết ra bất kỳ có thể được tiêu thụ bởi các vi sinh vật khác có mặt trong sản phẩm sữa lên men.

Để khắc phục nhược điểm này, sáng chế đề xuất chủng đột biến có tính kháng 2-đeoxyglucoza của *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* hoặc là đã mất khả năng phát triển trên glucoza là nguồn cacbon hoặc có khả năng phát triển bị suy yếu trong điều kiện như vậy. Các chủng đột biến *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* không chỉ tiêu thụ glucoza được tiết vào sữa bởi vi sinh vật khác mà có thể có mặt, chúng còn tiết một lượng lớn glucoza vào môi trường xung quanh và điều bất ngờ là chúng vẫn có đầy đủ khả năng axit hóa sữa mặc dù thời gian axit hóa đến độ pH 5 bị chậm lại 2-5 giờ. Do đó, các chủng như vậy là hữu ích trong các ứng dụng sữa lên men.

Vi khuẩn dùng được trong thực phẩm như vậy có thể được sử dụng để bổ sung vào các sản phẩm sữa lên men có glucoza. Glucoza có độ ngọt cảm quan cao hơn cả lactoza và galactoza và như vậy việc tiết glucoza vào cơ chất sữa sẽ cho độ ngọt cảm quan (nội tại) cao hơn trong sản phẩm sữa lên men.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng khi cơ chất sữa lại được lên men bằng chủng *Streptococcus thermophilus* và chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* theo sáng chế lượng lactoza trong sữa giảm đi đáng kể.

Không dung nạp lactoza là tình trạng không có khả năng tiêu hóa lactoza. Phần lớn những người không dung nạp lactoza có thể dung nạp một lượng lactoza nhất định trong chế độ ăn uống và khi lượng lactoza tiêu thụ tăng lên thì mức độ nghiêm

trọng của một số triệu chứng (bao gồm buồn nôn, chứng chuột rút, phồng rộp, tiêu chảy, và đầy hơi) cũng gia tăng.

Do đó, trong công nghệ thực phẩm có ý nghĩa lớn nếu có thể tạo ra sản phẩm thực phẩm hoặc là không chứa lactoza hoặc có hàm lượng lactoza giảm đi.

Cho đến nay không có tiêu chuẩn chung về giá trị giới hạn hàm lượng lactoza được xác định ở EU cho sản phẩm thực phẩm có hàm lượng lactoza thấp và không chứa lactoza nhưng Cơ quan an toàn thực phẩm Phần lan Finnish Food Safety Authority Evira quy định rằng các giá trị giới hạn ở bắc Âu là hàm lượng lactoza nhỏ hơn 10 mg/100 g hoặc 100 ml cho thực phẩm không chứa lactoza và hàm lượng lactoza là nhỏ hơn 1 g/100 g hoặc 100 ml cho thực phẩm có hàm lượng lactoza thấp.

Ngành công nghiệp sản xuất sữa ngày nay gặp vấn đề là tạo ra phương pháp khác để bổ sung chất làm ngọt vào các sản phẩm sữa được lên men để có được vị ngọt mong muốn mà không làm tăng lượng calo. Ngoài ra, sẽ là có lợi tìm ra được phương pháp làm giảm lượng lactoza ở các sản phẩm sữa được lên men đến mức chấp nhận được cho người tiêu thụ không dung nạp lactoza.

Các vấn đề nêu trên đã được giải quyết nhờ tạo ra các chủng *Streptococcus thermophilus* đột biến và các chủng đột biến *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* tiết glucoza vào sữa khi sữa 9,5% B được cấy 10^6 - 10^7 CFU/ml chủng *Streptococcus thermophilus* theo sáng chế hoặc 10^6 - 10^7 CFU/ml chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* theo sáng chế và được lên men nhờ các chủng *Streptococcus thermophilus* hoặc chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* theo sáng chế ở nhiệt độ 40°C trong thời gian ít nhất 20 giờ. Tốt hơn nếu, các chủng như vậy đột biến đơn lẻ sẽ tiết ít nhất 5 mg/ml glucoza vào sữa B khi sữa 9,5% B được cấy 10^6 - 10^7 CFU/ml chủng *Streptococcus thermophilus* theo sáng chế hoặc with 10^6 - 10^7 CFU/ml chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* theo sáng chế và được lên men bằng các chủng *Streptococcus thermophilus* hoặc chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* theo sáng chế ở nhiệt độ 40°C trong thời gian ít nhất 20 giờ. Các chủng này vẫn có đầy đủ khả năng axit hóa sữa mặc dù thời gian axit hóa đến pH 5 bị chậm lại 2-5 giờ. Sữa được lên men ở giai đoạn cuối chứa ít hơn 15 mg/ml

lactoza trong sữa đã lên men . Kết quả là sữa được lên men ở giai đoạn cuối chỉ số độ ngọt nội tại cao hơn khoảng 2 lần hoặc cao hơn.

Để tạo ra các chủng *Streptococcus thermophilus* này, các tác giả sáng chế đã tìm ra phương pháp phân lập các chủng đột biến có tính kháng 2-đeoxyglucoza từ chủng gốc *Streptococcus thermophilus* lên men galactoza, tốt hơn nếu là chủng với đột biến trong operon trên galactoza làm gia tăng biểu hiện của operon biểu hiện thấp hoặc không biểu hiện trước đây, trong đó kiểu hình kháng 2-đeoxyglucoza này gây ra do đột biến ở gen glucokinaza (*glcK*) làm bất hoạt một phần hoặc hoàn toàn protein được mã hóa. Phương pháp này bao gồm đưa chủng gốc tiếp xúc với 2-đeoxyglucoza và chọn lọc các chủng đột biến có khả năng phát triển khi có mặt 2-đeoxyglucoza trên các đĩa thạch chứa môi trường M17+2%galactoza, như vậy như mô tả ở Ví dụ 1 trong bản mô tả này. Các chủng đột biến này được sàng lọc và các chủng có tốc độ sinh trưởng trong môi trường M17+2% galactoza cao hơn trong môi trường M17+2% glucoza được lựa chọn.

Bất ngờ đã phát hiện ra rằng các chủng đột biến của *Streptococcus thermophilus* với đột biến ở gen glucokinaza (*glcK*) nhưng có hệ thống gen vận chuyển glucoza hoạt động rõ ràng là bình thường tiết glucoza. Các chủng đột biến này được đặt tên là CHCC15757 và CHCC15887.

Ngoài ra, các tác giả đã phát hiện ra rằng có thể chọn lọc được các chủng *Streptococcus thermophilus* có khả năng lên men lactoza và tiết glucoza thậm chí là cao hơn bằng cách đưa các chủng này *Streptococcus thermophilus* có đột biến ở gen glucokinaza tiếp xúc với 2-đeoxyglucoza và chọn lọc các chủng không thể phát triển trong sữa 9,5% B trừ khi cho thêm sucroza vào sữa B này ở nồng độ chỉ nhỏ 0,01 %. Một chủng đột biến tiết glucoza và lên men siêu lactoza như vậy được đặt tên là CHCC16404.

Đã phát hiện ra rằng CHCC16404 có đột biến ở gen vận chuyển glucoza (*manM*) dẫn đến làm bất hoạt protein gen vận chuyển glucoza chịu trách nhiệm cho vận chuyển glucoza vào tế bào.

Để tạo ra các chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, các tác giả sáng chế đã tìm ra phương pháp phân lập các chủng đột biến có tính kháng 2-deoxyglucoza của chủng gốc *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, mà hoặc là mất khả năng phát triển trên glucoza là nguồn cacbon hoặc có khả năng phát triển trên glucoza là nguồn cacbon suy yếu. Phương pháp bao gồm bước đưa chủng gốc tiếp xúc với 2-deoxyglucoza và chọn lọc các chủng đột biến có khả năng phát triển khi có mặt 2-deoxyglucoza trên các đĩa thạch chứa môi trường MRS-IM chứa 2% lactoza, chẳng hạn như được mô tả ở Ví dụ 5 trong bản mô tả này. Các chủng đột biến này được sàng lọc và các chủng mà hoặc đã mất hoàn toàn hoặc có khả năng phát triển trên MRS-IM chứa 2% glucoza suy yếu khi so với chủng gốc có thể phát triển glucoza được chọn lọc.

Dựa trên phát hiện bất ngờ này, sáng chế đề xuất các chủng vi khuẩn axit lactic mới, như đặc biệt là các chủng đột biến *Streptococcus thermophilus* với đột biến ở gen *glcK* hoặc *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, mà tiết glucoza vào sản phẩm được lên men để tạo ra độ ngọt tự nhiên mà không tăng thêm calo, phương pháp sản xuất các chủng này, các sản phẩm sữa được lên men được sản xuất bằng cách sử dụng các chủng như vậy và ứng dụng các chủng như vậy để tạo ra các sản phẩm sữa được lên men với độ ngọt tăng lên và giảm lượng lactoza.

Ngoài ra, các chủng *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* theo sáng chế bất ngờ được phát hiện là thúc đẩy sự sinh trưởng của chủng *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* BB-12đ, là vi khuẩn probiotic mà không phát triển tốt khi có mặt đơn lẻ trong sữa.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là sơ đồ thể hiện quá trình dị hóa lactoza ở *Streptococcus thermophilus*. *glcK*, glucokinaza; LacS, gen vận chuyển lactoza; LacZ, ò-galactosidaza; GalM, mutarotaza; GalK, galactokinaza; GalT, galactoza-1-phosphat uridyltransferaza; GalE, UDP-glucoza 4 epimeraza; GalP, galactoza-1-phosphat.

Fig. 2 thể hiện trình tự ADN (SEQ ID NO. 1) của gen glucokinaza (*glcK*) của *Streptococcus thermophilus* cũng như trình tự axit amin được mã hóa (SEQ ID NO. 2).

Các thay thế nucleotit đơn lẻ được tìm thấy lần lượt ở CHCC15757 và CHCC15887 được chỉ ra.

Fig. 3 thể hiện operon *man* mã hóa hệ thống glucoza/manoza phosphotransferaza (PTS) ở *Streptococcus thermophilus*. Khi so với chủng gốc, CHCC15757, đột biến tiết glucoza và lên men siêu lactoza CHCC16404 được tìm thấy là có đột biến ở gen *manM* mã hóa protein IIC^{Man} của PTS glucoza/manoza. Đột biến G thành T thay đổi codon GAA mã hóa axit glutamic ở vị trí axit amin 209 thành codon dừng TAA (*) làm mất sự dịch mã ở CHCC16404 và bất hoạt chức năng của protein.

Fig. 4 thể hiện trình tự ADN (SEQ ID NO. 5) của gen *manM* của chủng *Streptococcus thermophilus* CHCC15757 cũng như trình tự axit amin được mã hóa (SEQ ID NO. 6). Một thay thế nucleotit được tìm thấy ở CHCC16404 được thể hiện.

Mô tả chi tiết sáng chế

Như được sử dụng ở bản mô tả này, thuật ngữ "vi khuẩn axit lactic" dùng để chỉ vi khuẩn gram dương, ưa khí hoặc kỵ khí, lên men các đường để sản xuất ra các axit bao gồm axit lactic như là axit chủ yếu được tạo ra, axit axetic và axit propionic. Vi khuẩn axit lactic hữu ích nhất trong công nghiệp là thuộc bộ "Lactobacillales" bao gồm *Lactococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc spp.*, *Pediococcus spp.*, *Brevibacterium spp.*, *Enterococcus spp.* và *Propionibacterium spp.* Vi khuẩn axit lactic, bao gồm vi khuẩn thuộc các loài *Lactobacillus sp.* và *Streptococcus thermophilus*, thường được cung cấp cho công nghiệp sản xuất sữa hoặc dưới dạng nuôi cấy làm đông lạnh hoặc làm đông khô để bulk nhân giống ban đầu hoặc nuôi cấy được gọi là "làm đông trực tiếp trong hũ "Direct Vat Set"" (DVS), được dự định để cấy trực tiếp vào bình hoặc hũ lên men để sản xuất sản phẩm sữa, như sản phẩm sữa lên men. Các nuôi cấy như vậy thường được gọi là "giống khởi động" hoặc "giống ban đầu".

Việc sử dụng từ "a" và "an" và "the" và các từ tương tự trong bản mô tả tiếng Anh của sáng chế (đặc biệt là trong phần Yêu cầu bảo hộ) được xem là bao gồm cả dạng số ít và số nhiều, trừ khi được quy định khác đi trong bản mô tả này hoặc rõ ràng

là mâu thuẫn với phần nội dung. Các từ "chứa", "có", "bao gồm" và "có chứa" được dùng là các thuật ngữ có phạm vi mở (tức là có nghĩa "bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn trong số,") trừ khi được quy định khác đi. Việc nêu khoảng các giá trị trong bản mô tả này chỉ được dự định để cách viết tắt của từng giá trị nằm trong khoảng giá trị, trừ khi được quy định khác đi trong bản mô tả này, và mỗi giá trị riêng biệt được kết hợp vào bản mô tả như từng giá trị riêng biệt được nêu trong bản mô tả này. Tất cả các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này có thể được thực hiện theo trình tự thích hợp bất kỳ trừ khi được quy định khác đi trong bản mô tả này hoặc theo cách khác rõ ràng mâu thuẫn với nội dung. Việc sử dụng ví dụ bất kỳ và tất cả các ví dụ, hoặc ngôn ngữ ví dụ (ví dụ, "như") được nêu ra trong bản mô tả này, chỉ được dự định để minh họa rõ hơn sáng chế và không có nghĩa là giới hạn phạm vi của sáng chế trừ khi được yêu cầu bảo hộ theo cách khác. Không miêu tả nào trong bản mô tả chỉ ra rằng bất kỳ dấu hiệu không được nêu trong yêu cầu bảo hộ là dấu hiệu cần và đủ để thực hiện sáng chế.

Ở một số nước, định nghĩa hợp pháp của sữa chua đòi hỏi sự có mặt của cả *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Cả hai loài này tạo ra lượng axetaldehyt mong muốn, là một thành phần hương vị quan trọng trong sữa chua.

Pho mát, như Mozzarella và pho mát dùng làm bánh pizza cũng như Feta, cũng có thể được sản xuất bằng cách lên men bằng cách sử dụng cả *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Húrier et al. (2010) trong *The Technology of Cheesemaking*, 2nd Ed. Blackwell Publishing, Oxford; 166-192).

Để đáp ứng yêu cầu của công nghiệp thực phẩm, mong muốn phát triển các chủng mới, đặc biệt là các chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* và các chủng *Streptococcus thermophilus*, tạo ra độ ngọt tự nhiên hơn trực tiếp trong sản phẩm được lên men (độ ngọt bên trong) mà không làm tăng lượng calo.

Streptococcus thermophilus là một trong số các vi khuẩn axit lactic được sử dụng rộng rãi nhất để lên men sữa thương mại trong đó vi sinh vật này thường được sử dụng như là một phần của hỗn hợp giống khởi động, thành phần kia là *Lactobacillus*

sp., ví dụ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* dùng làm sữa chua và *Lactobacillus helveticus* dùng làm pho mát kiểu Thụy sỹ.

Lactoza và sucroza được lên men một cách dễ dàng hơn bởi *Streptococcus thermophilus* hơn là các monosacarit cấu thành nó. Chỉ có phần glucoza của phân tử lactoza được lên men bởi *Streptococcus thermophilus* và galactoza được tích lũy trong sản phẩm sữa được lên men khi sử dụng *Streptococcus thermophilus*. Trong sữa chua, trong đó nồng độ axit cao hạn chế quá trình lên men, trong khi galactoza tự do vẫn còn lại, trong khi đó galactoza tự do tạo ra ở các giai đoạn ban đầu của quá trình sản xuất pho mát Thụy sỹ được lên men sau đó bởi *Lactobacillus helveticus*. *Lactococcus lactis* được tìm thấy ở nhiều giống khởi động được sử dụng cho quá trình sản xuất pho mát cũng có khả năng tiêu thụ galactoza do *Streptococcus thermophilus* tạo ra.

Để đảm bảo rằng các chủng *Streptococcus thermophilus* với đặc tính sinh trưởng tối ưu nhất có thể, các tác giả sáng chế cho các chủng lên men galactoza *Streptococcus thermophilus* tiếp xúc với tác nhân chọn lọc 2-đeoxyglucoza. Thông thường các chủng đột biến có tính kháng 2-đeoxyglucoza có đột biến ở gen mã hóa glucokinaza và ở gen mã hóa vận chuyển glucoza. Các chủng đột biến được phân lập, CHCC15757, CHCC15887 và CHCC16404, có tính kháng 2-đeoxyglucoza có các đột biến ở gen glucokinaza (*glcK*) của nó. Ngoài đột biến ở gen glucokinaza, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng CHCC16404 có đột biến codon dừng ở gen vận chuyển glucoza/manoza điều này có thể giải thích tại sao glucoza được tiết ra ngoài không được chuyển vận lại vào tế bào nữa.

Bất ngờ, là các chủng đột biến đơn lẻ như vậy vẫn có đầy đủ khả năng axit hóa sữa mặc dù thời gian axit hóa đến độ pH 5 bị chậm lại 2-5 giờ. Do đó, các chủng như vậy là hữu ích trong các ứng dụng sữa lên men và chúng vẫn giữ được khả năng của các chủng mẹ (chủng gốc) để gây đông sữa là một đặc tính của sữa chua. Ngoài ra, đã phát hiện ra rằng các chủng đột biến này tiết ra nhiều hơn 5 mg/ml glucoza, khi sữa 9,5% B được cấy 10^6 - 10^7 CFU/ml chủng *Streptococcus thermophilus* CHCC15757 hoặc CHCC15887 và được lên men ở nhiệt độ 40°C trong thời gian ít nhất 20 giờ mà không cần phải phân lập các chủng đột biến vận chuyển glucoza, hoặc khi sữa 9,5% B có 0,05% sucroza được cấy 10^6 - 10^7 CFU/ml chủng *Streptococcus thermophilus*

CHCC16404 và được lên men ở nhiệt độ 40°C trong thời gian ít nhất 20 giờ. Đồng thời, tương ứng chỉ một lượng nhỏ khoảng 10 mg/ml lactoza và ít hơn 1,5 mg/ml lactoza (giới hạn phát hiện), vẫn còn trong sữa đã lên men này. Do đó, việc sử dụng các chủng như vậy để sản xuất các sản phẩm sữa được lên men có thể có ý nghĩa quan trọng cho người không dung nạp lactoza.

Kết quả là, sữa được lên men ở giai đoạn cuối có chỉ số độ ngọt nội tại cao hơn ít nhất bằng 2,0 theo tính toán của Godshall (1988. Food Technology 42(11):71-78).

Do đó, khía cạnh thứ nhất của sáng chế đề xuất chủng đột biến lên men galactoza từ *Streptococcus thermophilus*, trong đó chủng đột biến mang đột biến trong trình tự ADN của gen *glcK* mã hóa protein glucokinaza, trong đó đột biến làm bất hoạt protein glucokinaza được mã hóa hoặc có ảnh hưởng âm tính đến biểu hiện của gen này. Các phương pháp đo lường mức hoạt tính glucokinaza hoặc mức biểu hiện của gen glucokinaza được biết một cách dễ dàng (Porter et al. (1982) Biochim. Biophys. Acta, 709;178–186) và bao gồm các thử nghiệm enzym dùng kit và transcriptomic có trên thị trường hoặc định lượng PCR bằng cách sử dụng các chất liệu dễ dàng có được.

“Chủng” vi khuẩn như được sử dụng ở bản mô tả này dùng để chỉ vi khuẩn mà vẫn giữ được không có thay đổi về mặt di truyền khi sinh trưởng hoặc nhân lên. Sự nhân của vi khuẩn giống nhau được tính đến.

Thuật ngữ “các chủng lên men galactoza *Streptococcus thermophilus*” như được sử dụng ở bản mô tả này dùng để chỉ các chủng *Streptococcus thermophilus* có khả năng phát triển trên/trong môi trường M17+2% galactoza. Các chủng lên men galactoza *Streptococcus thermophilus* được định nghĩa trong bản mô tả này là các chủng *Streptococcus thermophilus* làm giảm độ pH của canh trường M17 chứa 2% galactoza như là hydrat cacbon duy nhất xuống 5,5 hoặc thấp hơn khi được cấy từ nuôi cấy qua đêm ở 1% và được ủ trong thời gian 24 giờ ở nhiệt độ 37°C.

Các chủng lên men galactoza có thể thu được bằng phương pháp như được mô tả trong WO 2011/026863.

Thuật ngữ “đột biến làm bất hoạt protein glucokinaza” như được sử dụng ở bản mô tả này dùng để chỉ đột biến tạo ra “protein glucokinaza bất hoạt”, là protein glucokinaza mà, nếu có mặt trong tế bào, không thể thực hiện chức năng bình thường của chúng cũng như các đột biến ngăn sự tạo thành protein glucokinaza hoặc dẫn đến sự thoái biến protein glucokinaza.

Cụ thể là, protein glucokinaza bất hoạt là protein mà so với protein glucokinaza chức năng không thể tạo thuận lợi cho quá trình phosphoryl hóa glucoza thành glucoza-6-phosphat hoặc chỉ cho quá trình phosphoryl hóa glucoza thành glucoza-6-phosphat diễn ra ở mức giảm đáng kể. Gen mã hóa protein glucokinaza bất hoạt như vậy so với gen mã hóa protein glucokinaza chức năng chứa đột biến ở khung đọc mở (open reading frame: ORF) của gen, trong đó đột biến này có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn trong số, khuyết đoạn, đột biến dịch khung, đưa vào codon dừng hoặc đột biến dẫn đến tạo ra thay thế axit amin, mà làm thay đổi đặc tính chức năng của protein, hoặc đột biến ở gen khởi đầu làm giảm hoặc hủy bỏ sự phiên mã hoặc dịch mã của gen.

Theo các phương án được ưu tiên, đột biến này làm giảm mức độ hoạt động (mức phosphoryl hóa glucoza thành glucoza-6-phosphat) của protein glucokinaza ít nhất 50%, như ít nhất 60%, như ít nhất 70%, như ít nhất 80%, như ít nhất 90%.

Hoạt tính glucokinaza có thể được xác định bằng thử nghiệm enzym glucokinaza như được mô tả trong Pool *et al.* (2006. *Metabolic Engineering* 8;456-464).

Thuật ngữ “protein glucokinaza chức năng” như được sử dụng ở bản mô tả này dùng để chỉ protein glucokinaza mà, nếu có mặt trong tế bào, tạo thuận lợi cho quá trình phosphoryl hóa glucoza thành glucoza-6-phosphat. Cụ thể là, protein glucokinaza chức năng có thể được mã hóa bởi gen chứa ORF mà có trình tự tương ứng với vị trí 1-966 trong SEQ ID NO. 1 hoặc trình tự có độ đồng nhất ít nhất 85%, như ít nhất độ đồng nhất 90%, như độ đồng nhất ít nhất 95%, như độ đồng nhất ít nhất 98%, như độ đồng nhất ít nhất 99%, với trình tự tương ứng với vị trí 1-966 của SEQ ID NO. 1.

Phần trăm đồng nhất của hai trình tự có thể được xác định bằng cách sử dụng các thuật toán, như thuật toán của Karlin và Altschul (1990. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87;2264), thuật toán biến đổi như được mô tả trong Karlin và Altschul (1993. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90;5873-5877); thuật toán của Myers và Miller (1988. CABIOS 4;11-17); thuật toán của Needleman và Wunsch (1970. J. Mol. Biol. 48;443-453); và thuật toán của Pearson và Lipman (1988. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85;2444-2448). Chương trình phần mềm để xác định mức đồng nhất trình tự axit nucleic hoặc axit amin trên cơ sở các thuật toán này cũng đã biết. Ví dụ, việc so sánh các trình tự nucleotit có thể được thực hiện bằng chương trình BLASTN, điểm=100, chiều dài từ=12. Việc so sánh các trình tự axit amin có thể được thực hiện bằng chương trình BLASTX, điểm=50, chiều dài từ=3. Đối với các thông số còn lại của chương trình BLAST, có thể áp dụng các thông số mặc định.

Ở nhiều nước việc sử dụng sinh vật biến đổi di truyền (GMO) cho các sản phẩm sữa được lên men là không được phép. Thay vì vậy, sáng chế đề xuất phương pháp thu nhận các chủng có trong tự nhiên hoặc được gây đột biến mà có thể tạo ra sự tích tụ glucoza mong muốn trong sản phẩm sữa lên men.

Do đó, theo một phương án rất được ưu tiên của sáng chế, chủng đột biến là chủng đột biến có trong tự nhiên hoặc chủng được gây đột biến.

“Chủng vi khuẩn đột biến” hoặc “chủng đột biến” như được sử dụng ở bản mô tả này dùng để chỉ chủng vi khuẩn đột biến tự nhiên (tự phát, có trong tự nhiên) hoặc chủng vi khuẩn được gây đột biến chứa một hoặc nhiều đột biến trong hệ gen của nó (ADN) mà là vắng mặt trong ADN kiểu đại. “Chủng được gây đột biến” là vi khuẩn trong đó đột biến được gây ra do xử lý của con người, như xử lý bằng tác nhân gây đột biến hóa chất, chiếu tia UV hoặc gama v.v. Ngược lại, “chủng đột biến tự phát” hoặc “chủng đột biến có trong tự nhiên” không bị gây đột biến bởi con người. Chủng vi khuẩn đột biến trong bản mô tả này là sinh vật không làm biến đổi di truyền (non-genetically cải biến organism), tức là không được cải biến bằng công nghệ ADN tái tổ hợp.

“Chủng kiểu đại” dùng để chỉ dạng không có đột biến của vi khuẩn, như được tìm thấy trong tự nhiên.

Các thuật ngữ như “các chủng có đặc tính tạo vị ngọt”, “các chủng có thể tạo ra sự tích tụ glucoza mong muốn trong sản phẩm sữa lên men” và “các chủng có đặc tính nâng cao về làm ngọt tự nhiên sản phẩm thực phẩm” được sử dụng thay cho nhau trong bản mô tả này để đặc tả khía cạnh ưu tiên của việc sử dụng các chủng theo sáng chế trong quá trình lên men các sản phẩm sữa.

Theo một phương án được ưu tiên, chủng đột biến *Streptococcus thermophilus* theo sáng chế gia tăng lượng glucoza trong sữa 9,5% B đến ít nhất 5 mg/ml khi được cấy vào sữa 9,5% B ở nồng độ 10^6 - 10^7 CFU/ml và cho phát triển ở nhiệt độ 40°C trong thời gian ít nhất 20 giờ.

Theo một phương án được ưu tiên khác, chủng đột biến *Streptococcus thermophilus* theo sáng chế gia tăng lượng glucoza trong sữa 9,5% B có 0,05% sucroza đến ít nhất 5 mg/ml khi được cấy vào sữa 9,5% B có 0,05% sucroza ở nồng độ 10^6 - 10^7 CFU/ml và cho phát triển ở nhiệt độ 40°C trong thời gian ít nhất 20 giờ.

Trong phạm vi sáng chế, sữa 9,5% B là sữa được đun sôi được tạo ra từ bột sữa gầy ít béo hoàn nguyên đến mức chất khô 9,5% và được tiệt trùng ở nhiệt độ 99°C trong thời gian 30 phút, tiếp đó là làm nguội xuống 40°C.

Theo các phương án được ưu tiên hơn của sáng chế, chủng đột biến dẫn đến sự tăng lượng glucoza đến ít nhất 6 mg/ml, như ít nhất 7 mg/ml, như ít nhất 8 mg/ml, như ít nhất 9 mg/ml, như ít nhất 10 mg/ml, như ít nhất 11 mg/ml, như ít nhất 12 mg/ml, như ít nhất 13 mg/ml, như ít nhất 14 mg/ml, như ít nhất 15 mg/ml, như ít nhất 20 mg/ml, như ít nhất 25 mg/ml.

Theo một phương án khác của sáng chế, chủng đột biến của *Streptococcus thermophilus* có tính kháng 2-đeoxyglucoza.

Thuật ngữ “có tính kháng 2-đeoxyglucoza” trong bản mô tả này được định nghĩa là chủng vi khuẩn đột biến nhất định có khả năng phát triển thành khuẩn lạc khi được cấy thành vạch trên đĩa chứa môi trường M17 chứa 20 mM 2-đeoxyglucoza sau

khi ủ ở nhiệt độ 40°C trong thời gian 20 giờ. Sự có mặt của 2-đeoxyglucoza trong môi trường nuôi cấy sẽ ngăn sự sinh trưởng của các chủng không được gây đột biến trong khi đó sự sinh trưởng của các chủng được gây đột biến không bị ảnh hưởng hoặc không bị ảnh hưởng đáng kể. Các chủng không được gây đột biến mà có thể được sử dụng làm các chủng đối chứng nhạy cảm trong việc đánh giá tính kháng tốt hơn nếu bao gồm các chủng CHCC14994 và CHCC11976.

Ví dụ 1 và 2 trong bản mô tả này đưa ra ví dụ quá trình phân lập các chủng đột biến *Streptococcus thermophilus* có tính kháng 2-đeoxyglucoza.

Còn theo một phương án nữa, chủng đột biến theo sáng chế có thể đặc trưng ở cách thức phát triển của nó. Quá trình này được thể hiện bởi phát hiện là tốc độ sinh trưởng của chủng đột biến trong môi trường M17+2% galactoza là cao hơn trong môi trường M17+2% glucoza. Tốc độ sinh trưởng được đo là sự biến đổi mật độ quang của nuôi cấy phát triển theo hàm số mũ ở 600 nanomet (OD₆₀₀) theo thời gian như được mô tả ở Ví dụ 2 trong bản mô tả này.

Theo một phương án được ưu tiên, tốc độ sinh trưởng là ít nhất 5% cao hơn, như ít nhất 10% cao hơn, như ít nhất 15% cao hơn, như ít nhất 20% cao hơn, trong môi trường M17+2% galactoza so với trong môi trường M17+2% glucoza.

Theo một phương án được ưu tiên, đột biến này tạo ra sự thay thế codon mã hóa serin bằng codon mã hóa prolin ở vị trí 72 trong SEQ ID NO. 2.

Tốt hơn nếu đột biến ở gen *glcK* tạo ra sự thay thế T bằng C ở vị trí 214 trong SEQ ID NO. 1.

Theo một phương án được ưu tiên khác, đột biến này tạo ra sự thay thế codon mã hóa threonin bằng codon mã hóa isoleuxin ở vị trí 141 trong SEQ ID NO. 2.

Tốt hơn nếu, đột biến ở gen *glcK* tạo ra sự thay thế C bằng T ở vị trí 422 trong SEQ ID NO. 1.

Cần phải nhấn mạnh là gen *glcK* của *Streptococcus thermophilus* có thể bị làm bất hoạt bởi các dạng đột biến khác ở các vị trí khác của gen *glcK*.

Theo một phương án được ưu tiên, chủng *Streptococcus thermophilus* mang đột biến làm giảm sự vận chuyển glucoza vào tế bào.

Thuật ngữ “đột biến làm giảm sự vận chuyển glucoza vào tế bào” như được sử dụng ở bản mô tả này dùng để chỉ đột biến ở gen mã hóa protein tham gia vào quá trình vận chuyển glucoza mà dẫn đến sự tích tụ glucoza trong môi trường của tế bào.

Mức glucoza trong môi trường nuôi cấy của chủng *Streptococcus thermophilus* có thể đo được một cách dễ dàng bằng các phương pháp đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này và như mô tả ở Ví dụ 4 trong bản mô tả này còn cả khi môi trường nuôi cấy là cơ chất sữa.

Theo các phương án được ưu tiên, đột biến này làm giảm sự vận chuyển glucoza vào tế bào ít nhất 50%, như ít nhất 60%, như ít nhất 70%, như ít nhất 80%, như ít nhất 90%.

Sự vận chuyển glucoza vào tế bào có thể được xác định bằng thử nghiệm hấp thu glucoza như được mô tả trong Cochu et al. (2003. Appl Environ Microbiol 69(9); 5423-5432).

Tốt hơn nữa, chủng *Streptococcus thermophilus* mang đột biến ở gen mã hóa một thành phần của gen vận chuyển glucoza, trong đó đột biến làm bất hoạt protein gen vận chuyển glucoza hoặc có ảnh hưởng âm tính đến biểu hiện của gen này.

Thành phần này có thể là một thành phần bất kỳ của protein gen vận chuyển glucoza là thiết yếu cho sự vận chuyển glucoza. Ví dụ, dự tính rằng việc làm bất hoạt một thành phần bất kỳ của PTS glucoza/manoza trong *Streptococcus thermophilus* được thể hiện ở Fig. 3 sẽ dẫn đến làm bất hoạt chức năng của gen vận chuyển glucoza.

Thuật ngữ “đột biến làm bất hoạt gen vận chuyển glucoza” như được sử dụng ở bản mô tả này dùng để chỉ đột biến mà tạo ra “gen vận chuyển glucoza được làm bất hoạt”, protein gen vận chuyển glucoza mà, nếu có mặt trong tế bào, không thể thực hiện chức năng bình thường của nó cũng như đột biến mà ngăn sự tạo thành protein gen vận chuyển glucoza hoặc dẫn đến sự thoái biến protein gen vận chuyển glucoza.

Cụ thể là, protein gen vận chuyển glucoza được làm bất hoạt là protein mà so với protein gen vận chuyển glucoza chức năng không thể tạo thuận lợi cho quá trình vận chuyển glucoza qua màng huyết tương hoặc tạo thuận lợi cho vận chuyển glucoza qua màng huyết tương ở mức độ giảm đi đáng kể. Gen mã hóa protein gen vận chuyển glucoza được làm bất hoạt như vậy so với gen mã hóa protein gen vận chuyển glucoza chức năng chứa đột biến trong khung đọc mở (ORF) của gen, trong đó đột biến nêu trên có thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn trong số, khuyết đoạn, đột biến dịch khung, đưa vào codon dừng hoặc đột biến dẫn đến thay thế axit amin, mà làm thay đổi đặc tính chức năng của protein, hoặc đột biến ở gen khởi đầu làm giảm hoặc hủy bỏ sự phiên mã hoặc dịch mã của gen.

Theo các phương án được ưu tiên đột biến này làm giảm mức độ hoạt động (mức vận chuyển glucoza) của protein gen vận chuyển glucoza đến ít nhất 50%, như ít nhất 60%, như ít nhất 70%, như ít nhất 80%, như ít nhất 90%.

Hoạt tính gen vận chuyển glucoza có thể được xác định bằng thử nghiệm hấp thu glucoza như được mô tả trong Cochun et al. (2003. Appl Environ Microbiol 69(9); 5423-5432).

Thuật ngữ “protein gen vận chuyển glucoza chức năng” như được sử dụng ở bản mô tả này dùng để chỉ protein gen vận chuyển glucoza mà, nếu có mặt trong tế bào, tạo thuận lợi cho vận chuyển glucoza qua màng huyết tương.

Được ưu tiên hơn là chủng *Streptococcus thermophilus* mang đột biến trong trình tự ADN của gen *manM* mã hóa protein IIC^{Man} của hệ thống glucoza/manoza phosphotransferaza, trong đó đột biến làm bất hoạt protein IIC^{Man} hoặc có ảnh hưởng âm tính đến biểu hiện của gen này.

Theo một phương án được ưu tiên hơn nữa, đột biến này tạo ra sự thay thế codon mã hóa axit glutamic bằng codon dừng ở vị trí 209 của SEQ ID NO. 6 của protein IIC^{Man} của hệ thống glucoza/manoza phosphotransferaza. Tốt hơn nếu, đột biến này tạo ra sự thay thế G bằng T ở vị trí 625 của SEQ ID NO. 5.

Khía cạnh thứ hai của sáng chế đề xuất chủng *Streptococcus thermophilus* được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Streptococcus thermophilus* CHCC15757 được lưu giữ ở Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen với số lưu giữ DSM 25850, chủng *Streptococcus thermophilus* CHCC15887 được lưu giữ ở Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen với số lưu giữ DSM 25851, chủng *Streptococcus thermophilus* CHCC16404 được lưu giữ ở Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen với số lưu giữ DSM 26722 và các chủng có nguồn gốc từ chúng.

Trong phạm vi của sáng chế, thuật ngữ "các chủng có nguồn gốc từ chúng" phải được hiểu là các chủng thu được từ, hoặc các chủng mà có thể thu được từ chủng (hoặc chủng gốc của chúng) theo sáng chế nhờ ví dụ kỹ thuật di truyền, bức xạ và/hoặc xử lý bằng hóa chất. Ngoài ra "các chủng có nguồn gốc từ chúng" cũng có thể là chủng đột biến xuất hiện tự phát. Được ưu tiên là "các chủng có nguồn gốc từ chúng" là chủng đột biến tương đương chức năng, ví dụ chủng đột biến về cơ bản có cùng đặc tính, hoặc đặc tính được cải thiện (ví dụ liên quan đến đặc tính tiết glucoza) như chủng gốc của chúng. "Các chủng có nguồn gốc từ chúng" như vậy là một phần của sáng chế. Đặc biệt là, thuật ngữ "các chủng có nguồn gốc từ chúng" dùng để chỉ các chủng thu được bằng cách đưa chủng theo sáng chế xử lý làm phát sinh đột biến được dùng thông thường bất kỳ bao gồm xử lý bằng tác nhân gây đột biến hóa chất như etan metan sulphonat (EMS) hoặc N-metyl-N'-nitro-N-nitroguanidin (NTG), chiếu tia UV, hoặc chủng đột biến xuất hiện tự phát. Chủng đột biến có thể được xử lý một số xử lý làm phát sinh đột biến (một xử lý đơn phải được hiểu là một bước làm phát sinh đột biến tiếp đó là bước sàng lọc/chọn lọc), nhưng hiện nay tốt hơn nếu không nhiều hơn 20, hoặc không nhiều hơn 10, hoặc không nhiều hơn 5, lần xử lý (hoặc các bước sàng lọc/chọn lọc) được thực hiện. Trong một chủng đột biến được ưu tiên hiện nay ít hơn 1%, ít hơn 0,1%, ít hơn 0,01%, ít hơn 0,001% hoặc thậm chí ít hơn 0,0001% nucleotit trong hệ gen vi khuẩn đã được thay bằng nucleotit khác, hoặc được bỏ đi, so với chủng gốc.

Theo đó, theo một phương án được ưu tiên chủng *Streptococcus thermophilus* được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Streptococcus thermophilus* CHCC15757 được lưu giữ ở Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen với số lưu giữ

DSM 25850, chủng *Streptococcus thermophilus* CHCC15887 được lưu giữ ở Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen với số lưu giữ DSM 25851, chủng *Streptococcus thermophilus* CHCC16404 được lưu giữ ở Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen với số lưu giữ DSM 26722 và chủng đột biến có nguồn gốc từ các chủng này, trong đó chủng đột biến được thu nhận bằng cách sử dụng một trong số các chủng được lưu giữ này làm nguyên liệu, và trong đó chủng đột biến này duy trì được hoặc cải thiện hơn nữa đặc tính lên men lactoza và/hoặc đặc tính tiết glucoza của chủng được lưu giữ trên đây.

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* là vi khuẩn axit lactic mà thường được sử dụng để lên men sữa thương mại trong đó sinh vật này thường được sử dụng như là một phần của hỗn hợp giống khởi động.

Lactoza lại được lên men một cách dễ dàng hơn các monosacarit glucoza, fructoza, và manoza bởi *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* và các chủng của các loài này thường không phát triển trên galactoza (Buchanan R.E., Gibbons N.E., eds (1974): Bergey's manual of determinative bacteriology (The Williams & Wilkins Co. Baltimore, Md), 8th ed.). Trong quá trình lên men lactoza bởi *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, chỉ có phần glucoza của phân tử lactoza được lên men và do đó galactoza được tích lũy trong các sản phẩm sữa được lên men.

Để thu được các chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* mà không thể phát triển trên glucoza là nguồn cacbon, các tác giả sáng chế cho các chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* tiếp xúc với 2-đeoxyglucoza. Các chủng đột biến được phân lập có tính kháng với 2-đeoxyglucoza và có khả năng phát triển trong cơ chất sữa mà không sử dụng glucoza làm nguồn cacbon. Các chủng đột biến này được nhận thấy là làm gia tăng hàm lượng glucoza của sữa. Theo đó, các sản phẩm sữa được lên men được tạo ra bằng cách sử dụng các chủng này đặc trưng ở chỗ có lượng glucoza cao hơn làm cho các sản phẩm này có vị ngọt hơn.

Bất ngờ, các chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* theo sáng chế đơn lẻ vẫn có đầy đủ khả năng axit hóa sữa mặc dù thời gian axit hóa đến độ pH 5 bị chậm lại 2-5 giờ. Ngoài ra, như được thể hiện trong các Ví dụ, đã phát hiện ra rằng các chủng này tiết ra khoảng 5 mg/ml glucoza hoặc cao hơn trong khi đó còn ít hơn

khoảng 10 mg/ml lactoza trong sữa đã lên men này khi sữa 9,5% B được cấy 10^6 - 10^7 CFU/ml chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* theo sáng chế và được lên men bằng chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* theo sáng chế ở nhiệt độ 40°C trong thời gian ít nhất 20 giờ. Do đó, việc sử dụng các chủng như vậy để sản xuất các sản phẩm sữa được lên men có thể có ý nghĩa quan trọng cho những người không dung nạp lactoza.

Kết quả là, sữa được lên men ở giai đoạn cuối có chỉ số độ ngọt nội tại cao hơn bằng khoảng 2 hoặc cao hơn được tính toán như được mô tả trong Godshall (1988. Food Technology 42(11):71-78), như 2,5 hoặc cao hơn hoặc như 3 hoặc cao hơn.

Khía cạnh thứ ba theo sáng chế đề xuất chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, trong đó chủng nêu trên có tính kháng 2-đeoxyglucoza.

Thuật ngữ “có tính kháng 2-đeoxyglucoza” liên quan đến chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* được định nghĩa là chủng vi khuẩn nhất định có khả năng phát triển thành khuẩn lạc sau khi ủ ở nhiệt độ 40°C trong thời gian 20 giờ khi được cấy thành vạch trên đĩa chứa môi trường MRS-IM chứa 2% lactoza và 20 mM 2-đeoxyglucoza. Sự có mặt của 2-đeoxyglucoza trong môi trường nuôi cấy sẽ ngăn cản sự sinh trưởng của các chủng không có tính kháng trong khi đó sự sinh trưởng của các chủng có tính kháng không bị ảnh hưởng hoặc không bị ảnh hưởng đáng kể. Các chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* không có tính kháng có thể được sử dụng làm các chủng đối chứng nhạy cảm để đánh giá tính kháng bao gồm các chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC759, được lưu giữ ở Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) với số lưu giữ DSM 26419 và CHCC10019, được lưu giữ ở Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) với số lưu giữ DSM 19252.

Trong trường hợp các đĩa thạch MRS-IM chứa 2% lactoza và ngoài ra chứa 20 mM 2-đeoxyglucoza đĩa này có sự phát triển quá mức của khuẩn lạc, thì thích hợp làm gia tăng nồng độ của 2-đeoxyglucoza ở các đĩa này, ví dụ đến 30 mM hoặc thậm chí 40 mM hoặc cao hơn. Trong trường hợp không thu được khuẩn lạc, thích hợp để giảm nồng độ của 2-đeoxyglucoza ở các đĩa này, ví dụ xuống 15 mM hoặc 10 mM hoặc

thậm chí còn thấp hơn. Nếu xem xét cần thiết, mức gây đột biến có thể tăng lên bằng cách sử dụng phương pháp gây đột biến vật lý hoặc hóa học thích hợp.

Tốt hơn nữa, chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* theo sáng chế làm gia tăng lượng glucoza trong sữa 9,5% B lên ít nhất 5 mg/ml khi được cấy vào sữa 9,5% B ở nồng độ 10^6 đến 10^7 CFU/ml và cho phát triển ở nhiệt độ 40°C trong thời gian ít nhất 20 giờ, như nằm trong khoảng từ 20 đến 30 giờ, như trong thời gian 20 giờ.

Theo các phương án được ưu tiên hơn của sáng chế chủng đột biến dẫn đến sự tăng lượng glucoza đến ít nhất 6 mg/ml, như ít nhất 7 mg/ml, như ít nhất 8 mg/ml, như ít nhất 9 mg/ml, như ít nhất 10 mg/ml, như ít nhất 11 mg/ml, như ít nhất 12 mg/ml, như ít nhất 13 mg/ml, như ít nhất 14 mg/ml, như ít nhất 15 mg/ml.

Khía cạnh thứ tư theo sáng chế đề xuất chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* mà được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16159, được lưu giữ ở Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) với số lưu giữ DSM26420, chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16160, được lưu giữ ở Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) với số lưu giữ DSM26421, và các chủng có nguồn gốc từ chúng.

Thuật ngữ “các chủng có nguồn gốc từ chúng” phải được hiểu như được xác định ở trên.

Theo đó, theo một phương án được ưu tiên chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16159, được lưu giữ ở Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) với số lưu giữ DSM26420, chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16160, được lưu giữ ở Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) với số lưu giữ DSM26421 và chủng đột biến có nguồn gốc từ các chủng này, trong đó chủng đột biến được thu nhận bằng cách sử dụng một trong số các chủng được lưu giữ này làm nguyên liệu, và trong đó chủng

đột biến này duy trì được hoặc cải thiện hơn nữa đặc tính lên men lactoza và/hoặc đặc tính tiết glucoza của chủng được lưu giữ trên đây.

Khía cạnh thứ năm theo sáng chế đề xuất chế phẩm chứa trong khoảng từ 10^4 đến 10^{12} CFU (đơn vị khuẩn lạc)/g chủng *Streptococcus thermophilus* theo khía cạnh thứ nhất hoặc thứ hai của sáng chế, như từ 10^5 đến 10^{11} CFU/g, như từ 10^6 đến 10^{10} CFU/g, hoặc như từ 10^7 đến 10^9 CFU/g của chủng *Streptococcus thermophilus*.

Theo một phương án được ưu tiên, chủng *Streptococcus thermophilus* gọi là không thể axit hóa sữa 9,5% B, được định nghĩa là tạo ra sự giảm độ pH ít hơn 1,0 khi sữa 9,5% B được cấy 10^6 - 10^7 CFU/ml chủng *Streptococcus thermophilus* và được ủ trong thời gian 14 giờ ở nhiệt độ 40°C , và chế phẩm còn chứa với một lượng hợp chất, mà có thể gây ra sự axit hóa sữa 9,5% B bởi chủng *Streptococcus thermophilus* CHCC16404 được lưu giữ ở Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen với số lưu giữ DSM 26722, được định nghĩa là tạo ra sự giảm độ pH bằng 1,0 hoặc cao hơn khi sữa 9,5% B được cấy 10^6 - 10^7 CFU/ml chủng *Streptococcus thermophilus* và được ủ trong thời gian 14 giờ ở nhiệt độ 40°C .

Tốt hơn nếu, hợp chất này là sucroza.

Tốt hơn nếu, lượng sucroza nằm trong khoảng từ 0,000001% đến 2%, như từ 0,00001% đến 0,2%, như từ 0,0001% đến 0,1%, như từ 0,001% đến 0,05%.

Theo một phương án được ưu tiên đặc biệt, chế phẩm này còn chứa từ 10^4 đến 10^{12} CFU/g chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* theo sáng chế, như từ 10^5 đến 10^{11} CFU/g, như từ 10^6 đến 10^{10} CFU/g, hoặc như từ 10^7 đến 10^9 CFU/g của chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Chế phẩm được ưu tiên theo sáng chế chứa, ví dụ, chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16159 và/hoặc chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16160 kết hợp với chủng *Streptococcus thermophilus* CHCC15757. Chế phẩm được ưu tiên hơn nữa chứa chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16159 và/hoặc *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16160 kết hợp với chủng *Streptococcus thermophilus* CHCC15887. Chế phẩm

còn được ưu tiên hơn nữa chứa chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16159 và/hoặc *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16160 kết hợp với chủng *Streptococcus thermophilus* CHCC16404.

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* và các vi khuẩn axit lactic khác thường được sử dụng làm giống khởi động đóng vai trò kỹ thuật trong sản xuất các thực phẩm khác nhau, như trong công nghiệp sản xuất sữa, như các sản phẩm sữa được lên men. Do đó, theo một phương án được ưu tiên khác chế phẩm này là thích hợp làm giống khởi động.

Giống khởi động có thể được dùng giống khởi động ở dạng đông lạnh hoặc làm khô ngoài giống khởi động lỏng. Do đó, theo một phương án được ưu tiên hơn nữa chế phẩm này ở dạng làm đông lạnh, làm đông khô hoặc lỏng.

Như được bộc lộ trong WO 2005/003327, có lợi nếu bổ sung tác nhân bảo vệ đông lạnh vào giống khởi động. Do đó, chế phẩm giống khởi động theo sáng chế có thể chứa một hoặc nhiều tác nhân bảo vệ đông lạnh được chọn từ nhóm bao gồm inosin-5'-monophosphat (IMP), adenosin -5'-monophosphat (AMP), guanosin-5'-monophosphat (GMP), uranosin-5'-monophosphat (UMP), xytidin-5'-monophosphat (CMP), adenin, guanin, uraxil, xytosin, adenosin, guanosin, uridin, xytidin, hypoxantin, xantin, hypoxantin, orotidin, thymidin, inosin và dẫn xuất của các hợp chất bất kỳ như vậy.

Khía cạnh thứ sáu theo sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men bao gồm bước cấy và bước lên men cơ chất sữa bằng ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* theo khía cạnh thứ nhất hoặc thứ hai của sáng chế.

Thuật ngữ "sữa" được hiểu là sự tiết từ tuyến sữa thu được bằng cách lấy sữa động vật có vú bất kỳ, như bò, cừu, dê, trâu hoặc lạc đà. Theo một phương án được ưu tiên, sữa là sữa bò.

Thuật ngữ "cơ chất sữa" có thể là chất liệu sữa thô và/hoặc được xử lý bất kỳ mà có thể được xử lý lên men theo phương pháp của sáng chế. Do đó, cơ chất sữa hữu

ích bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn trong số dung dịch/huyền phù của sữa hoặc sản phẩm giống sữa bất kỳ chứa protein, như sữa nguyên kem hoặc tách béo, bột sữa gầy, buttermilk, sữa bột hoàn nguyên, sữa đặc, sữa bột, nước sữa, váng sữa (whey permeate), lactoza, nước cái từ quá trình kết tinh lactoza, whey protein dạng đậm đặc, hoặc kem tươi. Rõ ràng là, cơ chất sữa này có thể có nguồn gốc từ động vật có vú bất kỳ, ví dụ là sữa của động vật có vú về cơ bản tinh khiết, hoặc sữa bột hoàn nguyên.

Tốt hơn nếu, ít nhất một phần của protein trong cơ chất sữa này là protein có tự nhiên trong sữa, như casein hoặc whey protein. Tuy nhiên, một phần của protein có thể là protein không có tự nhiên trong sữa.

Trước khi lên men, cơ chất sữa có thể được làm đồng nhất hoá và được tiệt trùng theo phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

“Đồng nhất hóa” như được sử dụng ở bản mô tả này dùng để chỉ việc trộn kỹ để thu được huyền phù hoặc nhũ tương hòa tan. Nếu quá trình đồng nhất hoá được thực hiện trước khi lên men, thì quá trình này có thể được thực hiện để phá vỡ chất béo trong sữa thành kích cỡ nhỏ hơn để nó không còn tách ra khỏi sữa nữa. Quá trình này có thể được thực hiện bằng cách đưa sữa ở áp suất cao qua các lỗ nhỏ.

“Tiệt trùng” như được sử dụng ở bản mô tả này dùng để chỉ việc xử lý cơ chất sữa để làm giảm hoặc hạn chế sự có mặt của các sinh vật sống, như vi sinh vật. Tốt hơn nếu, quá trình tiệt trùng được thực hiện bằng cách duy trì nhiệt độ nhất định trong khoảng thời gian nhất định. Thông thường, nhiệt độ nhất định đạt được bằng cách gia nhiệt. Nhiệt độ và khoảng thời gian có thể được lựa chọn để giết chết hoặc làm bất hoạt vi khuẩn nhất định, như vi khuẩn gây hại. Sau đó có thể tiến hành bước làm mát nhanh.

“Lên men” trong các phương pháp theo sáng chế dùng để chỉ việc chuyển hóa hydrat cacbon thành rượu hoặc axit nhờ tác động của vi sinh vật. Tốt hơn nếu, quá trình lên men trong các phương pháp theo sáng chế bao gồm bước chuyển hóa lactoza thành axit lactic.

Quá trình lên men dùng để sản xuất sản phẩm sữa lên men đã được biết rõ và chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết cách thức lựa chọn các điều kiện quy trình thích hợp, như nhiệt độ, oxy, lượng và đặc tính của vi sinh vật và thời gian xử lý. Hiển nhiên là điều kiện lên men được lựa chọn sao cho đạt được mục tiêu sáng chế, tức là để thu được sản phẩm sữa ở dạng rắn hoặc lỏng (sản phẩm sữa lên men).

Thuật ngữ “sản phẩm sữa lên men” như được sử dụng ở bản mô tả này dùng để chỉ sản phẩm thực phẩm hoặc thức ăn gia súc trong đó việc điều chế sản phẩm thực phẩm hoặc thức ăn gia súc bao gồm việc lên men cơ chất sữa bằng vi khuẩn axit lactic. “Sản phẩm sữa lên men” như được sử dụng ở bản mô tả này bao gồm nhưng không chỉ giới hạn trong số các sản phẩm như sữa chua, pho mát, kem chua (sour cream) và buttermilk cũng như nước sữa whey được lên men.

Theo một phương án được ưu tiên nồng độ của tế bào *Streptococcus thermophilus* được cấy là nằm trong khoảng từ 10^4 đến 10^9 CFU tế bào *Streptococcus thermophilus* cho mỗi ml cơ chất sữa, như từ 10^4 CFU đến 10^8 CFU tế bào *Streptococcus thermophilus* cho mỗi ml cơ chất sữa.

Theo một phương án được ưu tiên khác chủng *Streptococcus thermophilus* gọi là không thể axit hóa sữa 9,5% B, được định nghĩa là tạo ra sự giảm độ pH nhỏ hơn 1,0 khi sữa 9,5% B được cấy 10^6 - 10^7 CFU/ml chủng *Streptococcus thermophilus* và được ủ trong thời gian 14 giờ ở nhiệt độ 40°C , và cơ chất sữa này được cho thêm một lượng hợp chất, hữu hiệu để làm axit hóa sữa 9,5% B bởi chủng *Streptococcus thermophilus* CHCC16404 được lưu giữ ở Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen với số lưu giữ DSM 26722, được định nghĩa là tạo ra sự giảm độ pH bằng 1,0 hoặc cao hơn khi sữa 9,5% B được cấy 10^6 - 10^7 CFU/ml chủng *Streptococcus thermophilus* này và được ủ trong thời gian 14 giờ ở nhiệt độ 40°C .

Tốt hơn nếu, hợp chất này là sucroza.

Tốt hơn nếu, lượng sucroza là nằm trong khoảng từ 0,000001% đến 2%, như từ 0,00001% đến 0,2%, như từ 0,0001% đến 0,1%, như từ 0,001% đến 0,05%.

Khía cạnh thứ bảy theo sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men bao gồm bước cấy và bước lên men cơ chất sữa bằng ít nhất một chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* theo khía cạnh thứ ba hoặc thứ tư của sáng chế.

Theo một phương án được ưu tiên nồng độ của tế bào *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* được cấy là nằm trong khoảng từ 10^4 đến 10^9 CFU tế bào *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* cho mỗi ml cơ chất sữa, như từ 10^4 CFU đến 10^8 CFU tế bào *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* cho mỗi ml cơ chất sữa.

Theo một phương án được ưu tiên, phương pháp dùng để sản xuất sản phẩm sữa lên men bao gồm bước cấy và bước lên men cơ chất sữa bằng ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* theo sáng chế và ít nhất một chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* theo sáng chế.

Theo một phương án được ưu tiên khác, sản phẩm sữa lên men này là sữa chua hoặc pho mát.

Ví dụ về pho mát được tạo ra bằng cách lên men bằng *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* bao gồm pho mát Mozzarella và pho mát dùng làm bánh piza (Húrier et al. (2010) trong The Technology of Cheesemaking, 2nd Ed. Blackwll Publishing, Oxford; 166-192).

Tốt hơn nếu sản phẩm sữa lên men này là sữa chua.

Trong phạm vi sáng chế, nuôi cấy giống khởi động sữa chua là nuôi cấy vi khuẩn chứa ít nhất một chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* và ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus*. Theo sau đây, thuật ngữ “sữa chua” dùng để chỉ sản phẩm sữa lên men thu được bằng cách cấy và lên men sữa bằng chế phẩm chứa chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* và chủng *Streptococcus thermophilus*.

Theo khía cạnh thứ tám, sáng chế đề xuất sản phẩm sữa lên men thu được bằng phương pháp theo khía cạnh thứ sáu hoặc thứ bảy của sáng chế.

Theo khía cạnh thứ chín, sáng chế đề xuất sản phẩm sữa lên men chứa ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* theo khía cạnh thứ nhất hoặc thứ hai của sáng chế.

Theo khía cạnh thứ mười, sáng chế đề xuất sản phẩm sữa lên men chứa ít nhất một chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* theo khía cạnh thứ ba hoặc thứ tư của sáng chế.

Theo một phương án được ưu tiên, sản phẩm sữa lên men chứa ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* theo sáng chế và ít nhất một chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* theo sáng chế.

Theo một phương án được ưu tiên khác, sản phẩm sữa lên men là sữa chua hoặc pho mát. Tốt hơn nữa, sản phẩm sữa lên men là sữa chua.

Theo khía cạnh thứ mười một, sáng chế đề xuất việc sử dụng chủng *Streptococcus thermophilus* theo khía cạnh thứ nhất hoặc thứ hai của sáng chế để tạo ra sản phẩm sữa lên men.

Theo khía cạnh thứ mười hai, sáng chế đề xuất việc sử dụng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* theo khía cạnh thứ ba hoặc thứ tư của sáng chế để tạo ra sản phẩm sữa lên men.

Khía cạnh thứ mười ba của sáng chế đề xuất việc sử dụng chủng *Streptococcus thermophilus* theo sáng chế và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* theo sáng chế để tạo ra sản phẩm sữa lên men.

Khía cạnh thứ mười bốn đề xuất việc sử dụng chủng *Streptococcus thermophilus* theo khía cạnh thứ nhất hoặc thứ hai của sáng chế để làm tăng độ ngọt của sản phẩm sữa lên men.

Khía cạnh thứ mười lăm theo sáng chế đề xuất việc sử dụng chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* theo khía cạnh thứ ba và thứ tư của sáng chế để làm tăng độ ngọt của sản phẩm sữa lên men.

Khía cạnh thứ mười sáu theo sáng chế đề xuất việc sử dụng chủng *Streptococcus thermophilus* theo khía cạnh thứ nhất hoặc thứ hai của sáng chế và chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* theo khía cạnh thứ ba và thứ tư của sáng chế để làm tăng độ ngọt của sản phẩm sữa lên men.

Đặc biệt là, trẻ con là nhóm tiêu thụ có xu thế ưa thích sản phẩm thực phẩm có vị ngọt và dự tính rằng chủng *Streptococcus thermophilus* theo sáng chế và chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* theo sáng chế có thể là đặc biệt hữu ích trong việc làm tăng độ ngọt của sản phẩm sữa lên men dự định dùng cho trẻ con.

Khía cạnh thứ mười bảy theo sáng chế đề xuất sản phẩm sữa lên men theo sáng chế để sử dụng làm giảm lượng calo đưa vào.

Sản phẩm sữa lên men theo sáng chế được cho là đặc biệt hữu ích trong chế độ ăn cho người bị thừa cân hoặc béo phì.

Do đó, theo một phương án được ưu tiên, sản phẩm sữa lên men theo sáng chế là dùng để làm giảm lượng calo đưa vào ở người bị thừa cân hoặc béo phì.

Theo định nghĩa của Tổ chức y tế thế giới (WHO) thừa cân và béo phì là sự tích lũy bất thường và dư chất béo gây nguy cơ cho sức khỏe. Chỉ số khối lượng cơ thể (Body Mass Index: BMI) có thể được sử dụng là hướng dẫn cơ bản để phân loại tình trạng thừa cân và béo phì ở người lớn và được tính toán là khối lượng của một người theo kilogam chia cho bình phương của chiều cao của người đó tính theo mét (kg/m^2). Theo định nghĩa của WHO, chỉ số BMI cao hơn hoặc bằng 25 là tình trạng thừa cân và chỉ số BMI cao hơn hoặc bằng 30 là tình trạng béo phì.

Khía cạnh thứ mười tám theo sáng chế đề xuất việc sử dụng chủng *Streptococcus thermophilus* theo khía cạnh thứ nhất hoặc thứ hai của sáng chế để làm giảm hàm lượng lactoza trong sản phẩm sữa lên men.

Theo khía cạnh mười chín, sáng chế đề xuất việc sử dụng chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* theo khía cạnh thứ ba hoặc thứ tư của sáng chế để làm giảm hàm lượng lactoza trong sản phẩm sữa lên men.

Theo khía cạnh hai mươi, sáng chế đề xuất việc sử dụng chủng *Streptococcus thermophilus* theo khía cạnh thứ nhất hoặc thứ hai của sáng chế và chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* theo khía cạnh thứ ba hoặc thứ tư của sáng chế để làm giảm hàm lượng lactoza trong sản phẩm sữa lên men.

Theo khía cạnh thứ hai một, sáng chế đề xuất sản phẩm sữa lên men theo sáng chế để sử dụng tránh hội chứng không dung nạp lactoza.

Theo khía cạnh thứ hai mươi hai, sáng chế đề xuất chế phẩm theo sáng chế dùng để làm thuốc.

Theo khía cạnh thứ hai mươi ba, sáng chế đề xuất việc sử dụng chủng *Streptococcus thermophilus* theo sáng chế để cải thiện sự sinh trưởng của chủng *Bifidobacterium*.

Theo một phương án được ưu tiên chủng *Bifidobacterium* này thuộc các loài được chọn từ nhóm bao gồm *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium brevis*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium adolescentis* và *Bifidobacterium infantis*, như chủng được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12đ được lưu giữ ở Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) với số lưu giữ DSM 15954, chủng *Bifidobacterium animalis* được lưu giữ ở DSMZ với số lưu giữ, DSM 15954, chủng *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* được lưu giữ ở DSMZ với số lưu giữ DSM 15953 và chủng *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* được lưu giữ ở DSMZ với số lưu giữ DSM 15955.

Chủng *Bifidobacterium* được ưu tiên nhất là *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12đ được lưu giữ ở DSMZ với số lưu giữ DSM 15954.

Theo khía cạnh thứ hai mươi tư, sáng chế đề xuất việc sử dụng chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* theo sáng chế để cải thiện sự sinh trưởng của chủng *Bifidobacterium*.

Theo một phương án được ưu tiên chủng *Bifidobacterium* thuộc các loài được chọn từ nhóm bao gồm *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*,

Bifidobacterium lactis, *Bifidobacterium brevis*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium adolescentis* và *Bifidobacterium infantis*, như chủng được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12đ được lưu giữ ở Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) với số lưu giữ DSM 15954, chủng *Bifidobacterium animalis* được lưu giữ ở DSMZ với số lưu giữ, DSM 15954, chủng *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* được lưu giữ ở DSMZ với số lưu giữ DSM 15953 và chủng *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* được lưu giữ ở DSMZ với số lưu giữ DSM 15955.

Chủng *Bifidobacterium* được ưu tiên nhất là *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12đ được lưu giữ ở DSMZ với số lưu giữ DSM 15954.

Theo khía cạnh thứ hai mươi năm, sáng chế đề xuất việc sử dụng chủng *Streptococcus thermophilus* theo sáng chế và chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* theo sáng chế để cải thiện sự sinh trưởng của chủng *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12đ được lưu giữ ở Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen với số lưu giữ DSM 15954.

2-đeoxyglucoza và yếu tố quyết định kiểu phát triển của vi khuẩn trong môi trường M17+2% galactoza so với trong môi trường M17+2% glucoza được sử dụng để chọn lọc vi khuẩn có đột biến ở gen glucokinaza (*glcK*).

Theo khía cạnh thứ hai mươi sáu, sáng chế đề xuất phương pháp sàng lọc và phân lập chủng *Streptococcus thermophilus* mang gen *glcK* đột biến. Phương pháp này bao gồm các bước sau đây:

- a) tạo ra chủng gốc *Streptococcus thermophilus* lên men galactoza;
- b) chọn lọc và phân lập từ vốn các chủng *Streptococcus thermophilus* đột biến thu được từ chủng gốc vốn các chủng *Streptococcus thermophilus* đột biến có tính kháng 2-đeoxyglucoza; và
- c) chọn lọc và phân lập từ vốn các chủng *Streptococcus thermophilus* đột biến chủng đột biến có tính kháng 2-đeoxyglucoza chủng *Streptococcus thermophilus* nếu

tốc độ sinh trưởng của chủng *Streptococcus thermophilus* đột biến này trong môi trường M17+2% galactosa là cao hơn trong môi trường M17+2% glucoza.

Thuật ngữ “có tính kháng 2-đeoxyglucoza” trong bản mô tả này được định nghĩa là chủng vi khuẩn đột biến nhất định có khả năng phát triển thành khuẩn lạc khi được cấy thành vạch trên đĩa chứa môi trường M17 chứa 2% lactosa hoặc 2% galactosa và chứa 20 mM 2-đeoxyglucoza sau khi ủ ở nhiệt độ 40°C trong thời gian 20 giờ. Sự có mặt của 2-đeoxyglucoza trong môi trường nuôi cấy sẽ ngăn sự sinh trưởng của các chủng không được gây đột biến trong khi đó sự sinh trưởng của các chủng được gây đột biến là không bị ảnh hưởng hoặc không bị ảnh hưởng đáng kể. Các chủng không được gây đột biến mà có thể được sử dụng làm các chủng đối chứng nhạy cảm trong việc đánh giá tính kháng bao gồm các chủng CHCC14994 và CHCC11976.

Ví dụ 1 và 2 trong bản mô tả này đưa ra ví dụ phân lập các chủng đột biến của *Streptococcus thermophilus* có tính kháng 2-đeoxyglucoza.

Theo một phương án được ưu tiên, phương pháp này còn bao gồm bước a) làm cho chủng gốc phát sinh đột biến, như tác động vào chủng gốc tác nhân gây đột biến hóa học và/hoặc vật lý.

Theo một phương án được ưu tiên khác, phương pháp còn bao gồm bước d) chọn lọc và phân lập từ vốn các chủng *Streptococcus thermophilus* có tính kháng 2-đeoxyglucoza thu được từ chủng *Streptococcus thermophilus* được chọn lọc ở bước c) chủng *Streptococcus thermophilus* nếu như tốc độ sinh trưởng của chủng *Streptococcus thermophilus* này là cao trong môi trường M17+2% sucroza nhưng bằng không hoặc giảm đi ít nhất 0-50% so với tốc độ sinh trưởng của chủng gốc trong môi trường M17+2% glucoza.

Các chủng mẹ (chủng gốc) *Streptococcus thermophilus* lên men galactosa có khả năng phát triển trên/trong môi trường M17+2% galactosa và được định nghĩa trong bản mô tả này là chúng có khả năng làm giảm độ pH trong canh trường M17 chứa 2% galactosa như là hydrat cacbon duy nhất xuống 5,5 hoặc thấp hơn khi được cấy từ nuôi cấy qua đêm ở 1% và được ủ trong thời gian 24 giờ ở nhiệt độ 37°C. Các

chủng dương tính với galactosa như vậy đã được mô tả trong tình trạng kỹ thuật và WO2011/026863 (Chr. Hansen A/S) mô tả phương pháp thu nhận các chủng như vậy.

Theo một phương án rất được ưu tiên, chủng gốc được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Streptococcus thermophilus* CHCC14994 được lưu giữ ở Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen với số lưu giữ DSM 25838, chủng *Streptococcus thermophilus* CHCC11976 được lưu giữ ở Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen với số lưu giữ DSM 22934, và các chủng có nguồn gốc từ chúng.

Trong phạm vi sáng chế, thuật ngữ "các chủng có nguồn gốc từ chúng" phải được hiểu là các chủng thu được từ, hoặc các chủng mà có thể thu được từ các chủng mẹ (chủng gốc) *Streptococcus thermophilus* lên men galactosa nhờ ví dụ kỹ thuật di truyền, bức xạ và/hoặc xử lý bằng hóa chất. Ngoài ra "các chủng có nguồn gốc từ chúng" cũng có thể là chủng đột biến xuất hiện tự phát. Được ưu tiên nếu "các chủng có nguồn gốc từ chúng" là chủng đột biến tương đương chức năng, ví dụ chủng đột biến về cơ bản có cùng đặc tính, hoặc đặc tính được cải thiện (ví dụ liên quan đến lên men galactosa) như chủng gốc của chúng. "Các chủng có nguồn gốc từ chúng" như vậy là một phần của sáng chế. Đặc biệt là, thuật ngữ "các chủng có nguồn gốc từ chúng" dùng để chỉ các chủng thu được bằng cách đưa chủng theo sáng chế đến xử lý làm phát sinh đột biến được dùng thông thường bất kỳ bao gồm xử lý bằng tác nhân gây đột biến hóa chất như etan metan sulphonat (EMS) hoặc N-metyl-N'-nitro-N-nitroguanidin (NTG), chiếu tia UV, hoặc chủng đột biến xuất hiện tự phát. Chủng đột biến có thể được xử lý một số lần làm phát sinh đột biến (xử lý đơn phải được hiểu là một bước làm phát sinh đột biến tiếp đó là bước sàng lọc/chọn lọc), nhưng hiện nay tốt hơn nếu không nhiều hơn 20, hoặc không nhiều hơn 10, hoặc không nhiều hơn 5, lần làm phát sinh đột biến (hoặc các bước sàng lọc/chọn lọc) được thực hiện. Trong một chủng đột biến được ưu tiên hiện nay có ít hơn 1%, ít hơn 0,1%, ít hơn 0,01%, ít hơn 0,001% hoặc thậm chí ít hơn 0,0001% nucleotit trong hệ gen vi khuẩn đã được thay bằng nucleotit khác, hoặc được bỏ đi, so với chủng gốc.

Theo khía cạnh thứ hai mươi bảy, chủng đột biến chủng *Streptococcus thermophilus* thu được bằng phương pháp theo khía cạnh thứ hai mươi bảy được tính đến trong bản mô tả này.

Theo khía cạnh thứ hai mươi tám, sáng chế đề xuất phương pháp sàng lọc và phân lập chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* với cơ chế trao đổi chất glucoza suy yếu. Phương pháp bao gồm các bước sau đây:

- a) tạo ra chủng gốc *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*;
- b) chọn lọc và phân lập từ vốn các chủng đột biến *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* thu được từ chủng gốc vốn các chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* có tính kháng 2-đeoxyglucoza; và
- c) chọn lọc và phân lập từ vốn các chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* có tính kháng 2-đeoxyglucoza chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* nếu tốc độ sinh trưởng của chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* trong môi trường MRS-IM+2% lactoza cao hơn trong môi trường MRS-IM+2% glucoza.

Việc phân lập các chủng đột biến của các chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* có tính kháng 2-đeoxyglucoza được mô tả chi tiết trong phần ví dụ. Dựa trên thử nghiệm chọn lọc kháng 2-đeoxyglucoza ở Ví dụ 5, chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể thử nghiệm thông thường chủng quan tâm nhất định (ví dụ chủng từ sản phẩm thương mại liên quan) nếu như chủng quan tâm cụ thể này có theo bản mô tả này tính kháng liên quan với 2-đeoxyglucoza. Dựa trên kiểu phát triển chủng đột biến kháng 2-đeoxyglucoza của Ví dụ 6 chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể thử nghiệm thông thường chủng quan tâm cụ thể (ví dụ một chủng từ sản phẩm thương mại liên quan) nếu như chủng quan tâm cụ thể này có kiểu phát triển liên quan là một đặc tính của chủng đột biến được chọn lọc.

Theo một phương án được ưu tiên, phương pháp này còn bao gồm bước a1) làm cho chủng gốc phát sinh đột biến, như tác động vào chủng gốc tác nhân gây đột biến hóa học và/hoặc vật lý.

Các chủng mẹ (chủng gốc) *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* có khả năng phát triển trên/trong môi trường MRS-IM+2% lactoza và được định nghĩa trong bản mô tả này là chúng có khả năng làm giảm độ pH trong canh trường MRS-IM chứa 2% lactoza như là hydrat cacbon duy nhất xuống 5,5 hoặc thấp hơn khi được cấy từ nuôi cấy qua đêm ở 1% và được ủ trong thời gian 24 giờ ở nhiệt độ 37°C.

Theo một phương án rất được ưu tiên, chủng gốc được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC759 được lưu giữ ở Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen với số lưu giữ DSM 26419, chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC10019 được lưu giữ ở Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen với số lưu giữ DSM 19252, và các chủng có nguồn gốc từ chúng.

Theo khía cạnh thứ hai mươi chín, chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* thu được bằng phương pháp theo khía cạnh khía cạnh thứ hai mươi tám được tính đến trong bản mô tả này.

Các phương án theo sáng chế được mô tả sau đây, nhưng không phải là các ví dụ nhằm giới hạn phạm vi sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Chất liệu và phương pháp

Môi trường:

Đối với *Streptococcus thermophilus*, môi trường được sử dụng là môi trường M17 đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Môi trường thạch M17 có thành phần như sau trên mỗi lít H₂O:

Thạch, 12,75 g

Axit ascorbic, 0,5 g

Casein pepton (tryptic), 2,5 g

đinatri ã-glyxerophosphat pentahydrat, 19 g

magie sulfat hydrat, 0,25 g

nước chiết thịt, 5 g

pepton từ thịt (peptic), 2,5 g

pepton từ đậu tương (papainic), 5 g

dịch chiết nấm men, 2,5 g

độ pH cuối $7,1 \pm 0,2$ (25°C)

và canh trường M17 có thành phần như sau trên mỗi lít H_2O :

ascorbic axit, 0,5 g

magie sulfat, 0,25 g

nước chiết thịt, 5 g

pepton từ thịt (peptic), 2,5 g

natri glyxerophosphat, 19 g

pepton từ đậu tương (papainic), 5 g

trypton, 2,5 g

dịch chiết nấm men, 2,5 g

độ pH cuối $7,0 \pm 0,2$ (25°C)

Nguồn cacbon được bổ sung gồm các chất vô trùng lactoza 20 g/l, glucoza 20 g/l hoặc galactoza 20 g/l.

Như đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này, môi trường M17 là môi trường được xem là thích hợp for sự sinh trưởng của *Streptococcus thermophilus*.

Ngoài ra, theo như hiểu biết của chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này, trong phạm vi sáng chế, dịch đặc M17 có thể được cung cấp bởi các nhà cung cấp khác nhau và không phụ thuộc vào nhà cung cấp cụ thể (trong phạm vi sai số đo lường tiêu chuẩn) áp dụng theo bản mô tả này, sẽ thu được cùng một kết quả liên quan kháng 2-deoxyglucoza cho tế bào quan tâm liên quan trong bản mô tả này.

Môi trường được sử dụng cho nuôi cấy *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* là môi trường MRS-IM. MRS-IM được sử dụng hoặc ở dạng các đĩa thạch hoặc môi trường lỏng.

Môi trường thạch MRS-IM có thành phần như sau trên mỗi lít H₂O:

Trypton	Oxoid L 42	10,0 g
Dịch chiết nấm men	Oxoid L 21	5,0 g
Tween 80	Merck nr 8,22187	1,0 g
K ₂ HPO ₄	Merck nr 105104	2,6 g
Na-axetat	Merck nr 106267	5,0 g
Điamoni-hydro-xitrat	Merck nr 101154	2,0 g
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	Merck nr 105882	0,2 g
MnSO ₄ , H ₂ O	Merck nr 105941	0,05 g
Thạch	SO-BI-GEL	13,0 g

Độ pH sau khi hấp tự động được điều chỉnh đến $6,9 \pm 0,1$ ở nhiệt độ 25°C.

Canh trường MRS-IM được sử dụng trong các Ví dụ sau đây dùng cho nuôi cấy lỏng có thành phần như sau trên mỗi lít H₂O:

Trypton	Oxoid L 42	10,0 g
Dịch chiết nấm men	Oxoid L 21	5,0 g
Tween 80	Merck nr 8,22187	1,0 g
K ₂ HPO ₄	Merck nr 105104	2,6 g
Na-axetat	Merck nr 106267	5,0 g
Điamoni-hydro-xitrat	Merck nr 101154	2,0 g
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	Merck nr 105882	0,2 g
MnSO ₄ , H ₂ O	Merck nr 105941	0,05 g

Độ pH sau khi hấp tự động được điều chỉnh đến $6,9 \pm 0,1$ ở nhiệt độ 25°C. Nguồn cacbon, lactoza 20g/l hoặc glucoza 20g/l, trước hết được lọc vô trùng và sau đó được cho vào canh trường được khử trùng.

Môi trường MRS-IM nêu trên có thể được thay đổi đến một phạm vi nào đó mà không ảnh hưởng đến khả năng môi trường giúp quá trình sinh trưởng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Ngoài ra, chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ được hiểu rằng dịch đặc MRS-IM hoặc các thành phần khác với thành phần đã nêu trên có thể nhận được từ các nhà cung cấp khác nhau và được sử dụng để điều chế môi trường MRS-IM. Các môi trường này sẽ được sử dụng tương tự nhau trong trong các ví dụ sau đây, đặc biệt là trong thử nghiệm chọn lọc tính kháng 2-deoxyglucoza.

Các chủng mẹ (chủng gốc)

Streptococcus thermophilus CHCC11976 (chủng lên men galactoza với đột biến ở gen *Galk* và tạo ra các exopolysacarit như được mô tả trong WO 2011/026863).

Streptococcus thermophilus CHCC14994 (chủng lên men galactoza).

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* CHCC759.

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* CHCC10019.

Các chủng có tính kháng 2-đeoxy-glucoza

Streptococcus thermophilus CHCC15757 (chủng đột biến có tính kháng 2-đeoxyglucoza của CHCC14994).

Streptococcus thermophilus CHCC15887 (chủng đột biến có tính kháng 2-đeoxyglucoza của CHCC11976).

Streptococcus thermophilus CHCC16404 (đột biến tiết glucoza và lên men siêu lactoza của CHCC15757).

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* CHCC16159 (chủng đột biến có tính kháng 2-đeoxyglucoza của CHCC759).

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* CHCC16160 (chủng đột biến có tính kháng 2-đeoxyglucoza của CHCC10019).

Ví dụ 1: Sử dụng 2-đeoxyglucoza để phân lập chủng đột biến glucoza kinaza của *Streptococcus thermophilus* với đặc tính tăng tiết glucoza.

Để phân lập chủng đột biến của chủng *Streptococcus thermophilus* CHCC11976 và của chủng *Streptococcus thermophilus* CHCC14994, các tế bào thu được từ sự sinh trưởng của một khuẩn lạc được cấy vào 10 ml canh trường M17 chứa 2% lactoza và được cho sinh trưởng qua đêm ở nhiệt độ 40°C.

Ngày tiếp theo, các chủng này được cấy thành các pha loãng liên tiếp trên các đĩa thạch M17 chứa 2% galactoza và dịch đậm đặc của 2-đeoxyglucoza có nồng độ 20 mM (CHCC14994) hoặc 30 mM (CHCC11976) và được ủ trong thời gian 20 giờ ở nhiệt độ 40°C. Các khuẩn lạc có tính kháng trước hết được cấy lại thành vạch trên cùng một loại đĩa thạch như môi trường chúng đã được chọn lọc. Các vi sinh vật sống sót được sử dụng để cấy canh trường M17 mới pha chứa hoặc 2% lactoza, 2% galactoza hoặc 2% glucoza và đếm mức phát triển.

Nghiên cứu này cho thấy là một số chủng đột biến có khả năng phát triển trên galactosa nhanh hơn trên glucoza được nhận diện như được phác thảo ở Ví dụ 2. Hai chủng đột biến như vậy là CHCC15757 và CHCC15887, tương ứng thu được từ CHCC14994 và CHCC11976.

Ví dụ 2: Kiểu phát triển của chủng đột biến kháng 2-đeoxyglucoza

Để đảm bảo cho việc chọn lọc chủng đột biến có tính kháng 2-đeoxyglucoza có thể phát triển trên galactosa, hai chủng được chọn từ bộ sưu tập chủng lên men galactosa được sử dụng. Trong khi các chủng lên men galactosa này vẫn phát triển trong pha cấp số nhân trong canh trường M17+2% glucoza nhanh hơn ít nhất 10% trong canh trường M17+2% galactosa, các dẫn xuất của chủng đột biến có tính kháng 2-đeoxyglucoza của CHCC11976 và CHCC14994, như CHCC15757 và CHCC15887, mặt khác được đặc trưng ở chỗ trong canh trường M17+2% galactosa phát triển nhanh hơn trong pha cấp số nhân so với canh trường M17+2% glucoza.

Sự phát triển trong pha cấp số nhân trong bản mô tả này được đo là sự thay đổi mật độ quang của nuôi cấy phát triển theo hàm số mũ ở 600 nanomet (OD_{600}) theo thời gian ở nhiệt độ 40°C.

Như đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này, giá trị này có thể thay đổi tùy theo từng loài khi nuôi cấy này trong pha phát triển theo hàm số mũ. Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết cách thức xác định sự phát triển trong pha cấp số nhân, ví dụ trong khoảng OD_{600} 0,1-1,0.

Mật độ quang (OD) của nuôi cấy được đo trong thiết bị đo quang phổ.

Kết luận:

Dựa trên kiểu phát triển của chủng đột biến kháng 2-đeoxyglucoza của ví dụ này 2 – đối với chủng quan tâm cụ thể (ví dụ chủng từ sản phẩm thương mại liên quan) – chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này thông thường có thể kiểm tra xem liệu nếu chủng quan tâm cụ thể có kiểu phát triển liên quan như nêu trong bản mô tả này là một đặc tính của chủng đột biến được chọn lọc.

Ví dụ 3: thử nghiệm phân tích đột biến của gen mã hóa glucoza kinaza.

Phân lập toàn bộ ADN từ các chủng đột biến được nhận diện ở Ví dụ 1 để thực hiện thử nghiệm phân tích đột biến trong gen mã hóa glucoza kinaza. Việc xác định trình tự gen glucoza kinaza đã cho thấy rằng gen ở CHCC15757 chứa đột biến không bảo toàn ở codon 141 tạo ra isoloxin thay vì codon tạo threonin. Việc xác định trình tự của gen từ chủng đột biến CHCC15887 cho thấy có đột biến ở codon 72 tạo ra thay đổi axit amin không bảo toàn từ serin thành prolin (Fig. 2)

Các chủng có tính kháng 2-đeoxyglucoza phù hợp với các điều kiện được nêu cụ thể ở Ví dụ 1 và 2 và được phân lập như mô tả ở Ví dụ 1 đặc trưng ở chỗ có đột biến ở gen mã hóa glucoza kinaza (*glcK*). Đột biến này có thể dẫn đến thay đổi axit amin của enzym được mã hóa hoặc dẫn đến tạo ra codon dừng mà sẽ cắt cụt enzym được mã hóa.

Để bộc lộ đột biến ở gen *glcK*, chủng quan tâm cụ thể được cho phát triển trong canh trường lỏng (M17) có bổ sung 2% lactoza ở nhiệt độ 40°C qua đêm. Sau khi phân lập ADN nhiễm sắc thể, ADN được xử lý phân tích PCR bằng cách sử dụng hai đoạn mồi bổ trợ vùng bảo toàn nằm ngay phía trước và nằm ngay phía sau gen mã hóa glucoza kinaza. Trình tự của các đoạn mồi là như sau:

GK1F: 5' CTT GGG TAA AAG GCT CTA TG 3' (SEQ ID NO. 3)

GK1R: 5' CGT TTT TCA ACA AAA AAG TGC TACC 3' (SEQ ID NO. 4)

Điều kiện cho các phản ứng PCR được nêu rõ bởi nhà sản xuất kit khuếch đại PCR (ROCHE) ví dụ

2 µl ADN nhiễm sắc thể

1 µl đoạn mồi GK1F

1 µl đoạn mồi GK1R

25 µl hỗn hợp gốc

21 µl H₂O

chương trình PCR: (94°C-1,5 phút., 50°C-1 phút., 72°C-1,5 phút.)x30

Việc khuếch đại PCR tạo ra mảnh 1168 bp. Sau khi tinh chế bằng cách sử dụng kit tinh chế PCR từ Biorad, mảnh PCR này được đem xác định trình tự ADN ở MacroGen bằng cách sử dụng hai đoạn mồi giống như đoạn mồi được sử dụng để khuếch đại.

Sau khi xác định trình tự, trình tự ADN được so sánh với trình tự của chủng gốc.

Ví dụ 4. Phân tích hydrat cacbon của sữa được lên men.

Trong thử nghiệm khác, xác định nồng độ đường của đường quan tâm trong sữa được lên men bằng tương ứng CHCC14994, CHCC11976, CHCC15757 và CHCC15887. Sữa 9,5% B được cấy 1% (10^6 - 10^7 CFU/ml) nuôi cấy được cho phát triển qua đêm trong canh trường M17 đã bổ sung 2% galactosa. Quá trình axit hóa được theo dõi bằng INTAB PC logger và phần mềm Easyview. Sau 30 giờ axit hóa ở nhiệt độ 40°C các mẫu sữa được đem phân tích HPLC để thu được hàm lượng của các đường và các axit quan tâm. Các đường cong axit hóa cho thấy là các chủng đột biến này có sự khởi đầu axit hóa hơi chậm hơn nhưng kết thúc ở độ pH tương tự nhau. Số liệu HPLC được trình bày trong Bảng 1.

Từ bảng 1 nhận thấy rằng hai chủng đột biến *glcK*, CHCC15757 và CHCC15887, tiêu thụ ít nhất 71% lactosa, trong khi đó các chủng mẹ (chủng gốc) tiêu thụ khoảng 28% lactosa. Đối với chủng đột biến lên men lactosa nhiều nhất, CHCC15887, chỉ còn lại lượng nhỏ 11,9 mg/ml trong sữa đã lên men này điều này cho thấy vai trò của sản phẩm này ngay cả cho những người không dung nạp lactosa. Rất đáng kể là hai chủng đột biến *glcK* đã tiết ra từ 8,3 đến 11,3 mg/ml glucoza trong khi sự tiết glucoza của các chủng mẹ (chủng gốc) là thấp hơn mức phát hiện. Đồng thời cả hai chủng đột biến còn tiết galactosa nhiều hơn các chủng mẹ (chủng gốc): nằm trong

khoảng từ 34 đến 52%. Lưu ý là độ ngọt của sucroza là 100 đối chứng, và độ ngọt của lactoza là 16, độ ngọt của galactoza là 32 và độ ngọt của glucoza là 74,3, tính toán độ ngọt tương đối của sản phẩm lên men cuối cho thấy độ ngọt khi được lên men bằng chủng đột biến tốt nhất CHCC15757 tăng 2,0 lần so với chủng gốc tương ứng CHCC14994.

Bảng 1: Số liệu HPLC của các mẫu sữa.

Mẫu Số	Lượng mg/ml	Lượng mg/ml	Lượng mg/ml	Lượng mg/ml	Lượng mg/ml	Lượng mg/ml	Lượng mg/ml	Độ ngọt
	Axit xitric	Axit lactic	Axit axit	Galactoz a	Glucoz a	Lactoza	Fructoz a	
Giới hạn phát hiện	<1,25	<1,25	<1,25	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	
Sữa	1,8	1,7	<1,25	<1,5	<1,5	47,6	<1,5	761,6
CHCC11976	2,0	8,2	<1,25	7,2	<1,5	34,4	<1,5	781
CHCC15887	1,8	7,8	<1,25	10,9	8,3	11,9	<1,5	1156
CHCC14994	1,8	7,2	<1,25	4,9	<1,5	34,3	<1,5	705,6
CHCC15757	1,7	7,1	<1,25	10,3	11,3	13,8	<1,5	1390

Độ ngọt được tính toán: $\text{mg/ml glucoza} \times 74 + \text{mg/ml lactoza} \times 16 + \text{mg/ml galactoza} \times 32$.

Vì hai chủng đột biến *glcK*, CHCC15757 và CHCC15887, tiết ra lượng cao glucoza, dự tính rằng các đột biến ở gen *glcK* làm bất hoạt protein glucokinaza được mã hóa.

Ví dụ 5: Chọn lọc các chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* có tính kháng 2-deoxyglucoza

Chọn lọc chủng đột biến có tính kháng 2-deoxyglucozas

Hai chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* quan tâm, CHCC759 và CHCC10019, được cấy độc lập nhau vào 10 ml canh trường MRS-IM được mô tả trên đây chứa 2% lactoza và được ủ kỵ khí ở nhiệt độ 40°C qua đêm. Trong bước tiếp theo, mẫu của các nuôi cấy này chứa khoảng 3×10^8 tế bào được cấy trên các đĩa

thạch MRS-IM chứa 2% lactoza và ngoài ra chứa 20 mM 2-đeoxyglucoza. Các khuẩn lạc phát triển trên các đĩa này tinh chế bằng một lần vạch khuẩn lạc trên các đĩa thạch MRS-IM chứa 2% lactoza và ngoài ra chứa 20 mM 2-đeoxyglucoza và được đặc tả thêm như được mô tả sau đây.

Thử nghiệm tính kháng 2-đeoxyglucoza:

Phương pháp sau thích hợp để xác định xem chủng quan tâm có tính kháng 2-đeoxyglucoza hay không. Chủng quan tâm được cấy vào 10 ml canh trường MRS-IM được mô tả trên đây chứa 2% lactoza và được ủ kỵ khí ở nhiệt độ 40°C qua đêm. Trong bước tiếp theo, các mẫu pha loãng của các nuôi cấy này chứa khoảng 10^4 - 10^5 tế bào được dàn mỏng trên các đĩa thạch MRS-IM chứa 2% lactoza và ngoài ra chứa cùng một nồng độ 2-đeoxyglucoza được sử dụng để chọn lọc chủng đột biến có tính kháng (thông thường ở nồng độ 20 mM nhưng các nồng độ khác có thể được sử dụng). Các đĩa thạch này được ủ trong điều kiện kỵ khí trong thời gian 20 giờ ở nhiệt độ 40°C và được theo dõi. Các chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* mà không có tính kháng 2-đeoxyglucoza nếu có sẽ chỉ tạo ra rất ít khuẩn lạc trong khi đó các chủng có tính kháng 2-đeoxyglucoza sẽ tạo ra vô số khuẩn lạc. Các mẫu đối chứng thích hợp bao gồm các chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, CHCC759 và CHCC10019, mà nhạy với 2-đeoxyglucoza ở nồng độ 20 mM và CHCC16159 và CHCC16160 có tính kháng 20 mM 2-đeoxyglucoza.

Kết quả: Một số dòng có khả năng phát triển trong điều kiện chọn lọc với sự có mặt 2-đeoxyglucoza được phân lập theo phương pháp này. Các chủng đột biến cho sự phát triển nhanh trên các đĩa có 2-đeoxyglucoza được ký hiệu là CHCC16159 (thu được từ chủng gốc CHCC759) và CHCC16160 (thu được từ chủng gốc CHCC10019). Các chủng này đột biến được nộp lưu ở Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH.

Ví dụ 6: Kiểu phát triển của chủng đột biến có tính kháng 2-đeoxyglucozas của *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Để đảm bảo rằng chủng đột biến có tính kháng 2-đeoxyglucoza *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* hoặc là mất khả năng phát triển trên glucoza hoặc suy

yếu khả năng phát triển trên glucoza là nguồn cacbon, kiểu phát triển của các chủng đột biến này được so sánh với kiểu phát triển các chủng mẹ (chủng gốc) bằng cách nuôi phát triển cả các chủng mẹ (chủng gốc), CHCC759 và CHCC10019, và các chủng đột biến, CHCC16159 và CHCC16160, trong canh trường MRS-IM chứa 2% glucoza.

Trong khi 2 chủng mẹ (chủng gốc), CHCC759 và CHCC10019, phát triển theo hàm số mũ trong canh trường MRS-IM được bổ sung 2% glucoza với thời gian nhân đôi nhỏ hơn 10 giờ, hai chủng đột biến có tính kháng 2-đeoxyglucoza CHCC16159 và CHCC16160 không phát triển hoặc chỉ phát triển rất từ từ trong môi trường này. Sự phát triển trong pha số mũ được theo dõi bằng cách đo mật độ quang của nuôi cấy phát triển theo hàm số mũ ở 600 nanomet (OD600) ở nhiệt độ 40°C trong thiết bị đo quang phổ. Pha số mũ của phát triển đạt được ở OD600 nằm trong khoảng 0,1-1,0.

Ví dụ 7: Phân tích hydrat cacbon của sữa được lên men bằng các chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Trong thử nghiệm khác, xác định nồng độ đường của các đường khác nhau trong sữa được lên men bằng các chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* tương ứng với CHCC759, CHCC10019, CHCC16159, và CHCC16160. 9,5 % sữa B được cấy 1% (10^6 - 10^7 CFU/ml) nuôi cấy lỏng được cho phát triển qua đêm kỵ khí trong canh trường MRS-IM chứa 2% lactoza. Quá trình sự axit hóa được theo dõi bằng INTAB PC logger và Phần mềm Easyview. Sau 30 giờ axit hóa ở nhiệt độ 40°C, các mẫu sữa được đem phân tích HPLC để đo lượng đường và axit hữu cơ khác nhau. Các đường cong axit hóa cho thấy là các chủng đột biến này có sự khởi đầu axit hóa hơi chậm đi và kết thúc ở độ pH hơi cao hơn. Số liệu HPLC được trình bày trong Bảng 2.

Như có thể nhận thấy từ bảng 2, hai chủng đột biến có tính kháng 2-đeoxyglucoza, CHCC16159 và CHCC16160, tiêu thụ ít nhất khoảng 94 % lactoza, trong khi đó các chủng mẹ (chủng gốc) tiêu thụ ít nhất khoảng 37 % lactoza. Đối với chủng đột biến này cho sản xuất axit lactic cao nhất, CHCC16160, chỉ một lượng nhỏ 2,9 mg/ml lactoza còn lại trong sữa đã lên men. Các sản phẩm sữa được lên men với lượng lactoza thấp như vậy có thể là thích hợp dùng cho người không dung nạp lactoza.

Điều có ý nghĩa là, hai chủng đột biến, CHCC16159 và CHCC16160, tiết trong khoảng từ 15,2 đến 15,8 mg/ml glucoza trong khi sự tiết glucoza của các chủng mẹ (chủng gốc) lần lượt là thấp dưới mức phát hiện đối với CHCC10019 và 4,2 mg/ml đối với CHCC759. Đồng thời cả hai các chủng đột biến cũng tiết nhiều galactoza hơn các chủng mẹ (chủng gốc). Nếu như giá trị đối chứng về độ ngọt của sucroza là 100, và độ ngọt của lactoza là 16, độ ngọt của galactoza là 32 và độ ngọt của glucoza là 74, tính toán độ ngọt tương đối của sản phẩm lên men cuối cho thấy là chủng đột biến CHCC16160 cho sản phẩm sữa lên men ngọt hơn 2,5 lần so với chủng gốc tương ứng CHCC10019.

Bảng 2: Số liệu HPLC của các mẫu sữa.

Mẫu	Lượng	Lượng	Lượng	Lượng	Lượng	Lượng	Lượng	
No.	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	
	Axit xitric	Axit lactic	Axit axetic	Galac- toza	Glu- coza	Lac-toza	Fruc- toza	độ ngọt
Giới hạn phát hiện	<1,25	<1,25	<1,25	<1,5	<1,5	<1,5	<1,5	
Sữa	1,9	<1,25	<1,25	<1,5	<1,5	55,5	<1,5	888
CHCC759	1,8	9,6	<1,25	13,1	4,2	18,1	<1,5	1021
CHCC16159	2,0	7,9	<1,25	21,4	15,2	1,7	<1,5	1841
CHCC10019	1,8	11,1	<1,25	12,4	>1,5	20,8	<1,5	730
CHCC16160	1,9	5,4	<1,25	19,4	15,8	2,9	<1,5	1841

Độ ngọt được tính toán: mg/ml glucoza *74 + mg/ml lactoza *16 + mg/ml galactoza * 32.

Ví dụ 8: Chọn lọc đột biến *Streptococcus thermophilus* tiết glucoza và lên men siêu lactoza

Để phân lập đột biến tiết glucoza và lên men siêu lactoza của chủng *Streptococcus thermophilus* CHCC15757, tế bào thu được từ sự sinh trưởng của một khuẩn lạc được cấy vào 10 ml canh trường M17 chứa 2% galactoza và được cho phát triển qua đêm ở nhiệt độ 40°C.

Ngày tiếp theo, chủng này được dàn thành mỏng thành các pha loãng liên tiếp

trên các đĩa thạch M17 chứa 2% galactosa và nồng độ 2-đeoxyglucoza bằng 30 mM và được ủ trong thời gian 20 giờ ở nhiệt độ 40°C. Các khuẩn lạc có tính kháng trước hết được cấy lại thành vạch trên cùng một loại đĩa thạch như môi trường chúng đã được chọn lọc. Các vi sinh vật sống sót được sử dụng để cấy canh trường M17 mới pha chứa hoặc 2% lactoza, 2% galactosa, 2% sucroza hoặc 2% glucoza.

Từ nghiên cứu này, các tác giả sáng chế có thể phân lập chủng đột biến, CHCC16404, thu được từ CHCC15757, mà không thể phát triển trong sữa B nhưng có thể phát triển trong M17 được bổ sung 2% sucroza ở nhiệt độ 40°C. Ngoài ra, CHCC16404 không thể phát triển trong M17 được bổ sung 2% glucoza.

Sự phát triển trong pha cấp số nhân trong bản mô tả này được đo là sự biến đổi mật độ quang của nuôi cấy phát triển theo hàm số mũ ở nhiệt độ 600 nanomet (OD₆₀₀) theo thời gian ở nhiệt độ 40°C.

Ví dụ 9: Kiểu phát triển của chủng đột biến tiết glucoza và lên men siêu lactoza Streptococcus thermophilus CHCC16404

Để đảm bảo sự duy trì và sinh trưởng phù hợp của chủng đột biến CHCC16404, chủng này được cho phát triển ở nhiệt độ 40°C trong môi trường M17 được bổ sung 2% sucroza. Các tác giả sáng chế bất ngờ nhận thấy rằng chủng đột biến CHCC16404 có thể axit hóa sữa 9,5% B chỉ khi chủng này được cấy 1% (10⁶-10⁷ CFU/ml) nuôi cấy được cho phát triển qua đêm trong canh trường M17 được bổ sung 2% sucroza hoặc khi sữa được cho vào sucroza. Các tác giả sáng chế nhận thấy là việc bổ sung chỉ lượng nhỏ 0,01 % sucroza vào sữa giúp CHCC16404 axit hóa sữa 9,5% B. Ngoài ra, CHCC16404 không thể phát triển trong M17 được bổ sung 2% glucoza ở nhiệt độ 40°C khác với chủng gốc CHCC15757 là có thể phát triển trong M17 được bổ sung glucoza trong cùng một điều kiện. Tổng hợp các kết quả này cho thấy rằng việc xử lý CHCC15757 bằng 2-đeoxyglucoza, giúp tạo ra CHCC16404, đã chọn lọc được đột biến làm bất hoạt hệ thống hấp thu glucoza phá vỡ sự hấp thu glucoza được tiết ra từ môi trường

Ví dụ 10: Phân tích hydrat cacbon của sữa được lên men bằng chủng đột biến tiết glucoza và lên men siêu lactoza Streptococcus thermophilus CHCC16404

Trong thử nghiệm khác, xác định nồng độ đường của các đường quan tâm trong sữa được lên men bằng CHCC16404. Các chai chứa sữa 9,5% B lần lượt được bổ sung 0,01%, 0,02%, 0,03% và 0,05% sucroza được cấy 1% (10^6 - 10^7 CFU/ml) nuôi cấy được cho phát triển qua đêm trong canh trường M17 đã bổ sung 2% sucroza. Theo dõi quá trình axit hóa bằng INTAB PC logger và phần mềm Easyview. Sau 30 giờ axit hóa ở nhiệt độ 40°C, các mẫu sữa được đem phân tích HPLC để xác định hàm lượng các đường và các axit liên quan.

Từ bảng 3 nhận thấy rằng đột biến tiết glucoza và lên men siêu lactoza CHCC16404, bất ngờ, tiêu thụ toàn bộ lactoza ở tất cả các nồng độ sucroza được bổ sung được thử nghiệm trong thử nghiệm này. Các tác giả sáng chế cũng đã nhận thấy rằng khi bổ sung nồng độ sucroza cao hơn (ví dụ > 0,1 mg/ml), quá trình lên men lactoza là không hoàn toàn trước khi đạt đến độ pH cuối. Ngoài ra Bảng 3 còn cho thấy là tất cả lactoza được chuyển hoá thành glucoza và galactoza và rằng chỉ một phần galactoza được sử dụng cho quá trình lên men ở tất cả các nồng độ sucroza được bổ sung. Điều được quan tâm là glucoza được tiết ra không bị hấp thu tiếp nhờ đó còn để lại hơn 23,9 mg/ml glucoza trong sữa. Vì khoảng 25% galactoza lại được lên men, nên còn hơn 16 mg/ml galactoza còn lại trong sữa sau khi lên men. Những số liệu này cho thấy rằng CHCC16404, ngoài đột biến *glcK* được thừa hưởng từ chủng gốc CHCC15757, còn gắn đột biến làm bất hoạt hệ thống hấp thu glucoza phá vỡ sự hấp thu glucoza được tiết ra từ môi trường. So sánh các số liệu trong Bảng 3 với các số liệu trong Bảng 1 và tính rằng độ ngọt đối chứng của sucroza là 100, và độ ngọt của lactoza là 16, độ ngọt của galactoza là 32 và độ ngọt của glucoza là 74,3, tính toán độ ngọt tương đối của sản phẩm lên men cuối cho độ ngọt khi được lên men bằng CHCC16404 cao hơn khoảng 3,5 lần so với chủng CHCC14994.

Bảng 3: Số liệu HPLC của các mẫu sữa.

Mẫu	Lượng	Lượng	Lượng	Lượng	Lượng	Lượng	
Số	mg/ml	Mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	
	Axit xitric	Axit lactic	Axit axetic	Galac-toza	Glu-coza	Lac-toza	độ ngọt
Giới hạn phát hiện	<1,25	<1,25	<1,25	<1,5	<1,5	<1,5	
Sữa	1,8	1,7	<1,25	<1,5	<1,5	47,6	762
CHCC16404+ 0,01% sucroza	1,9	5,4	<1,25	16,1	23,9	<1,5	2291
CHCC16404+ 0,02% sucroza	2,0	5,6	<1,25	17,0	25,3	<1,5	2424
CHCC16404+ 0,03% sucroza	2,0	5,6	<1,25	16,4	24,1	<1,5	2315
CHCC16404+ 0,05% sucroza	2,1	6,0	<1,25	17,3	25,4	<1,5	2441

độ ngọt được tính toán: mg/ml glucoza *74 + mg/ml lactoza *16 + mg/ml galactoza * 32.

Ví dụ 11: Phân tích hydrat cacbon của sữa được lên men bằng kết hợp của các chủng Streptococcus thermophilus và các chủng Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus

Trong thử nghiệm này, nồng độ của các đường và các axit hữu cơ được xác định trong sữa được lên men bằng kết hợp các chủng *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (được chọn từ CHCC759, CHCC10019, CHCC16159 và CHCC16160) và chủng *Streptococcus thermophilus* là hoặc CHCC14994, CHCC15757 hoặc CHCC16404.

Quá trình sản xuất sữa chua thường bao gồm việc sử dụng hỗn hợp giống khởi động chứa cả *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* và các chủng *Streptococcus thermophilus*. Thông thường, cơ chất sữa được sử dụng trong sản xuất sữa chua được cấy 1 phần *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* và 9 phần *Streptococcus thermophilus*. Để phân tích khả năng tiết glucoza trong phân tích chuẩn để sản xuất sữa chua, sữa 9,5% B được cấy 0,1 % *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* nuôi cấy được cho phát triển qua đêm kỵ khí trong canh trường MRS-IM chứa 2% lactoza và 0,9% *Streptococcus thermophilus* nuôi cấy được cho phát triển qua đêm trong canh trường M17 chứa 2% galactoza (CHCC15757) hoặc 2% sucroza (CHCC16404). Theo dõi quá trình axit hóa bằng INTAB PC logger và phần mềm

Easyview. Sau 30 giờ axit hóa, các mẫu sữa được đem phân tích HPLC để đo lượng các đường và các axit khác nhau. Số liệu HPLC được trình bày trong Bảng 4.

Từ bảng 4, có thể nhận thấy rằng việc sử dụng chủng đột biến có tính kháng 2-deoxyglucoza CHCC15757 và CHCC16404 của *Streptococcus thermophilus* dẫn đến sự tiết glucoza vào sữa cho dù nó được dùng kết hợp với chủng gốc *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* hoặc với chủng đột biến có tính kháng 2-deoxyglucoza của nó. Tuy nhiên, thu được nồng độ glucoza cao hơn khi dùng kết hợp của các chủng đột biến có tính kháng 2-deoxyglucoza thuộc cả hai loại, ví dụ kết hợp của CHCC15757 và CHCC16159, hoặc kết hợp của CHCC15757 và CHCC16160. Khi sử dụng các hỗn hợp nuôi cấy này, ít nhất 82% lactoza đã được nhận thấy là được tiêu thụ, và trong khoảng từ 11,8 mg/ml đến 14,1 mg/ml glucoza được nhận thấy là được tiết ra ngoài. Thu được các kết quả tương tự khi chủng *Streptococcus thermophilus* là CHCC15887 cũng là chủng đột biến có tính kháng 2-deoxyglucoza mang đột biến ở gen *glcK*.

Đồng thời, sự có mặt của chủng đột biến có tính kháng 2-deoxyglucoza ở giống khởi động cũng gây tiết nhiều galactoza hơn. Khi sử dụng kết hợp của các chủng đột biến, ví dụ CHCC15757 và CHCC16159, việc tiết galactoza là cao hơn khoảng 3 lần (17,1 mg/ml) so với giống khởi động chứa các các chủng mẹ (chủng gốc) tương ứng CHCC14994 và CHCC10019.

Sự tiết glucoza thậm chí là hiệu quả hơn khi dùng kết hợp chủng đột biến tiết glucoza và lên men siêu lactoza *Streptococcus thermophilus* CHCC16404 và các chủng đột biến có tính kháng 2-deoxyglucoza của *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, ví dụ kết hợp của CHCC16404 và CHCC16159, hoặc kết hợp của CHCC16404 và CHCC16160.

Với tính toán là độ ngọt của sucroza là 100 (giá trị đối chứng), và độ ngọt của lactoza là 16, độ ngọt của galactoza là 32 và độ ngọt của glucoza là 74, tính toán độ ngọt tương đối của sản phẩm lên men cuối, được thể hiện ở dòng cuối Bảng 4, cho thấy là các kết hợp khác nhau của các chủng cho phép xác định nồng độ cuối của lactoza, glucoza và galactoza còn lại trong sản phẩm lên men cuối. Nếu như muốn có sữa chua với độ ngọt bên trong cao nhất do nồng độ cao glucoza và galactoza được tiết

ra và không có lactoza thì kết hợp hiệu quả nhất của các chủng là CHCC16404 và CHCC16160. Kết hợp này tạo ra sữa chua có độ ngọt cao hơn 3,6 lần kết hợp tương ứng của các chủng nhạy 2-DG của *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, CHCC14994 và CHCC10019 và không còn lactoza ở mức phát hiện được trong sữa đã lên men này.

Bảng 4: Số liệu HPLC của các mẫu sữa được lên men bằng hỗn hợp nuôi cấy

Các chủng	Lượng	Lượng	Lượng	Lượng	Lượng	Lượng	
	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	
	Axit xitric	Axit lactic	Axit axetic	Galac-toza	Glu-coza	Lac-toza	độ ngọt
Giới hạn phát hiện	<1,25	<1,25	<1,25	<1,5	<1,5	<1,5	
Sữa	1,7	<1,25	<1,25	<1,5	<1,5	51,6	
CHCC14994+CHCC10019	1,8	7,6	<1,25	5,7	<1,5	33,6	722
CHCC14994+CHCC16159	1,9	7,7	<1,25	5,6	<1,5	36,4	762
CHCC15757+CHCC10019	1,7	9,7	<1,25	12,9	6,5	13,2	1108
CHCC15757+CHCC16159	2,0	10,4	<1,25	17,1	14,1	9,5	1743
CHCC14994 + CHCC759	1,7	7,4	<1,25	5,6	<1,5	31,6	686
CHCC14994 + CHCC16160	1,8	7,3	<1,25	5,5	<1,5	32,4	693
CHCC15757+CHCC759	2,1	13,8	<1,25	16,6	6,5	12,2	1209
CHCC15757+CHCC16160	2,0	8,7	<1,25	13,2	11,8	8,5	1432
CHCC16404+CHCC10019	2,2	8,1	<1,25	11,5	1,8	24,9	900,1
CHCC16404+CHCC16159	2,2	7,8	1,3	20,9	14,9	3,9	1838,3
CHCC16404+CHCC16160	2,3	7,7	<1,25	23,1	22,3	<1,5	2396,1
CHCC16404*+CHCC10019	2,1	10,7	<1,25	17,7	11,9	3,2	1501,8
CHCC16404*+CHCC16159	2,0	11,0	<1,25	22,2	20,2	<1,5	2211,3
CHCC16404*+CHCC16160	2,1	6,6	<1,25	18,3	25,8	<1,5	2502,5

* bổ sung 0,05 % sucroza

độ ngọt được tính toán: mg/ml glucoza *74 + mg/ml lactoza *16 + mg/ml galactoza * 32.

Ví dụ 12. Cải thiện sự sinh trưởng của *Bifidobacteria* bằng cách sử dụng chủng đột biến tiết glucoza của *Streptococcus thermophilus* và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Một số trong số các vi khuẩn probiotic được biết đến nhất *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12đ (có trên thị trường từ Chr. Hansen A/S, Hoersholm, Denmark) không phát triển tốt khi có mặt đơn lẻ trong môi trường trên cơ sở lactoza như sữa. Do đó trong thử nghiệm này, các tác giả sáng chế đã khảo sát tác động của việc dùng kết hợp *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12đ với chủng tiết glucoza *Streptococcus thermophilus* hoặc *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Thử nghiệm 1:

CHCC 5445 (BB-12đ) được cho sinh trưởng ở điều kiện kỵ khí qua đêm ở nhiệt độ 40°C trong MRS+0,05% xystein clorua.

CHCC14994 được cho phát triển qua đêm ở nhiệt độ 40°C trong M17 có 2% galactoza.

CHCC 15757 được cho phát triển qua đêm ở nhiệt độ 40°C trong M17 có 2% galactoza.

Thử nghiệm 2:

CHCC 5445 (BB-12đ) được cho sinh trưởng ở điều kiện kỵ khí qua đêm ở nhiệt độ 40°C trong MRS+0,05% xystein clorua.

CHCC10019 được cho phát triển qua đêm kỵ khí ở nhiệt độ 40°C trong MRS có 2% lactoza

CHCC16159 được cho phát triển qua đêm kỵ khí ở nhiệt độ 40°C trong MRS có 2% lactoza

Sáu chai có 200 ml sữa B được cấy ở nhiệt độ 40°C qua đêm với tổng cộng 1% nuôi cấy đã phát triển quá mức có mật độ quang tương đương:

1. 1% CHCC 5445 (BB-12đ).
2. 0,5% CHCC 5445 (BB-12đ) + 0,5 % CHCC14994
3. 0,5% CHCC 5445 (BB-12đ) + 0,5 % CHCC15757
4. 1% CHCC5445 (BB-12đ).
5. 0,5% CHCC 5445 (BB-12đ) + 0,5 % CHCC10019
6. 0,5% CHCC 5445 (BB-12đ) + 0,5 % CHCC16159

Chỉ có các chai 2-3 và 5-6 được axit hoá do đặc tính kém BB-12 trong sữa.

Sau khi lên men, 100 µl của mỗi nuôi cấy được dàn thành mỏng trong các dung dịch pha loãng khác nhau (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8}) trên các đĩa thạch chọn lọc cho sự sinh trưởng của BB-12đ cụ thể tức là MRS + 0,05% xystein clorua + tetraxyclin được bổ sung 10 µg/ml of tetraxyclin và sau đó được ủ kỵ khí qua đêm ở nhiệt độ 40°C. Số lượng khuẩn lạc được xác định sau đó bằng cách đếm và kết quả trung bình được đưa ra trong Bảng 5 là CFU/ml (đơn vị khuẩn lạc trên mililít).

Bảng 5. CFU/ml BB-12 trong nuôi cấy sữa được lên men

Thử nghiệm	Nuôi cấy	Cfu/ml
1	1% CHCC 5445 (BB-12)	4,50E+07
1	0,5% CHCC 5445 (BB-12) + 0,5 % CHCC14994	4,00E+07
1	0,5% CHCC 5445 (BB-12) + 0,5 % CHCC15757	4,00E+08
2	1% CHCC 5445 (BB-12)	6,00E+07
2	0,5% CHCC 5445 (BB-12) + 0,5 % CHCC10019	2,00E+07
2	0,5% CHCC 5445 (BB-12) + 0,5 % CHCC16159	1,40E+08

Chỉ khi chủng đột biến tiết glucoza của *Streptococcus thermophilus*, CHCC15757 và *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, CHCC16159 có mặt cùng với BB-12đ, thì sự sinh trưởng của BB-12đ được thúc đẩy và tổng lượng đếm tế bào được tính là CFU/ml cao hơn vào khoảng 10 x (1 log) trong các nuôi cấy này. Kết

quả này cho thấy là các chủng tiết glucoza có thể được sử dụng tăng hàm lượng của các chủng probiotic như BB-12đ khi được phối trộn cùng nhau trong nuôi cấy.

Ví dụ 13. So sánh hệ gen của CHCC15757 và CHCC16404 và nhận diện đột biến ở gen manM mã hóa protein IIC^{Man} của hệ thống glucoza /manozaphosphotransferaza (PTS)

Các chế phẩm gen ADN của CHCC15757 và CHCC16404 được xác định trình tự tại Beijing Genomics Institute (BGI, Beijing, China) và được lắp ghép và hoàn thành bằng cách sử dụng phần mềm xử lý hệ gen CLC (CLCBio, Århus, Denmark). Các trình tự hệ gen của CHCC15757 và CHCC16404 được sắp hàng bằng cách sử dụng trình tự hệ gen đã chú giải của CHRZ1066 làm đối chứng bằng cách sử dụng phần mềm Mauve 2.3.1. Sau khi sắp hàng, phân tích đa hình đơn nucleotit (single-nucleotide polymorphism : SNP) được thực hiện bằng cách sử dụng phần mềm không mất tiền Mauve 2.3.1 cho cả CHCC15757 và CHCC16404. Điều này cho phép nhận diện đột biến G thành T ở codon GAA (axit glutamic) ở vị trí axit amin 209 ở gen *manM* mã hóa protein IIC^{Man} của PTS glucoza/manoza. Thay đổi này đưa vào codon dừng TAA ở vị trí 209 của protein (Fig. 3) tạo ra sản xuất protein bị cắt cụt, và do đó, là protein không chức năng protein IIC^{Man}. Do đó, dự đoán rằng đột biến này ngăn sự vận chuyển glucoza vào tế bào thông qua glucoza /manozaphosphotransferaza (PTS).

Nộp lưu và ý kiến chuyên gia

Người nộp đơn yêu cầu rằng mẫu của các vi sinh vật được lưu giữ nêu ra sau đây chỉ có thể được cung cấp cho chuyên gia, cho đến ngày bằng sáng chế được cấp.

Chủng *Streptococcus thermophilus* CHCC15757 đã được nộp lưu ở Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany, ngày 3/4/2012 với số lưu giữ DSM 25850

Chủng *Streptococcus thermophilus* CHCC15887 đã được nộp lưu ở Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany, ngày 3/4/2012 với số lưu giữ DSM 25851

Chủng *Streptococcus thermophilus* CHCC16404 đã được nộp lưu ở Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany, ngày 12/12/ 2012 với số lưu giữ DSM 26722.

Chủng *Streptococcus thermophilus* CHCC14994 đã được nộp lưu ở Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany, ngày 3/4/2012 với số lưu giữ DSM 25838.

Chủng *Streptococcus thermophilus* CHCC11976 đã được nộp lưu ở Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany, ngày 8/9/2009 với số lưu giữ DSM 22934.

Chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC759 đã được nộp lưu ở Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany, ngày 6/9/2012 với số lưu giữ DSM 26419.

Chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC10019 đã được nộp lưu ở Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany, ngày 3/4/2007 với số lưu giữ DSM 19252.

Chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16159 đã được nộp lưu ở Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany, ngày 6/9/2012 với số lưu giữ DSM 26420.

Chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CHCC16160 đã được nộp lưu ở Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany, ngày 6/9/2012 với số lưu giữ DSM 26421.

Chủng *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CHCC5445 (BB-12đ) đã được nộp lưu ở Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH, Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig, Germany, ngày 30/9/2003 với số lưu giữ DSM 15954

Các nộp lưu được tiến hành theo hiệp ước Budapest về công nhận quốc tế lưu giữ vi sinh vật cho mục đích liên quan đến patent.

Các tài liệu tham khảo

WO 2011/026863

Pool *et al.* (2006) *Metabolic Engineering* 8(5); 456-464

Thompson *et al.* (1985) *J. Bacteriol.* 162(1); 217-223

Chervaux *et al.* (2000). *Appl and Environ Microbiol*, 66, 5306-5311

Cochu *et al.* (2003). *Appl and Environ Microbiol*, 69(9), 5423-5432

Húrier *et al.* (2010) *trong The Technology of Cheesemaking*, 2nd Ed. Blackwell Publishing, Oxford; 166-192.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chủng *Streptococcus thermophilus* lên men galactosa, trong đó chủng này mang đột biến trong trình tự ADN của gen *glcK* mã hóa protein glucokinaza, trong đó đột biến làm bất hoạt một phần hoặc hoàn toàn protein glucokinaza, nhờ đó làm cho chủng kháng lại 2-deoxyglucoza sao cho nó có thể phát triển thành tập đoàn khi được tạo sọc trên đĩa chứa môi trường M17 chứa 2% (trọng lượng/thể tích) lactoza hoặc 2% (trọng lượng/thể tích) galactosa, và 20mM 2-deoxyglucoza sau khi ủ ở 40°C trong 20 giờ.
2. Chủng *Streptococcus thermophilus*, trong đó chủng này được chọn từ nhóm bao gồm chủng *Streptococcus thermophilus* CHCC15757 được lưu giữ ở Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen với số lưu giữ DSM 25850, chủng *Streptococcus thermophilus* CHCC15887 được lưu giữ ở Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen với số lưu giữ DSM 25851, chủng *Streptococcus thermophilus* CHCC16404 được lưu giữ ở Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen với số lưu giữ DSM 26722.
3. Chế phẩm chứa từ 10^4 đến 10^{12} CFU/g chủng *Streptococcus thermophilus* theo điểm 1 hoặc 2.
4. Chế phẩm theo điểm 3, trong đó chế phẩm này còn chứa từ 10^4 đến 10^{12} CFU/g ít nhất một chủng *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, trong đó chủng này có tính kháng 2-deoxyglucoza sao cho nó có thể phát triển thành tập đoàn khi được tạo sọc trên đĩa chứa môi trường MRS-IM chứa 2% (trọng lượng/thể tích) lactoza, và 20mM 2-deoxyglucoza sau khi ủ ở 40°C trong 20 giờ.
5. Phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men bao gồm bước cấy và bước lên men nền sữa bằng ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* theo điểm 1 hoặc 2.

6. Phương pháp sản xuất sản phẩm sữa lên men bao gồm bước cấy và bước lên men nền sữa bằng ít nhất một chế phẩm theo điểm 3 hoặc 4.
7. Sản phẩm sữa lên men chứa ít nhất một chủng *Streptococcus thermophilus* theo điểm 1 hoặc 2.
8. Sản phẩm sữa lên men chứa chế phẩm theo điểm 3 hoặc 4.
9. Phương pháp sàng lọc và phân lập chủng *Streptococcus thermophilus* bằng gen *gick* đột biến, trong đó phương pháp bao gồm các bước sau đây:
 - a) tạo ra chủng gốc *Streptococcus thermophilus* lên men galactosa;
 - b) chọn lọc và phân lập từ quần thể các chủng *Streptococcus thermophilus* đột biến thu được từ chủng gốc quần thể các chủng *Streptococcus thermophilus* đột biến có tính kháng 2-deoxyglucoza sao cho nó có thể phát triển thành tập đoàn khi được tạo sọc trên đĩa chứa môi trường M17 chứa 2% (trọng lượng/thể tích) lactosa hoặc 2% (trọng lượng/thể tích) galactosa, và 20mM 2-deoxyglucoza sau khi ủ ở 40°C trong 20 giờ.;
 - c) chọn lọc và phân lập từ quần thể các chủng *Streptococcus thermophilus* có tính kháng 2-deoxyglucoza chủng *Streptococcus thermophilus* đột biến nếu như tốc độ phát triển của chủng *Streptococcus thermophilus* đột biến này trong môi trường M17+2% galactosa cao hơn trong môi trường M17+2% glucoza.

1/4

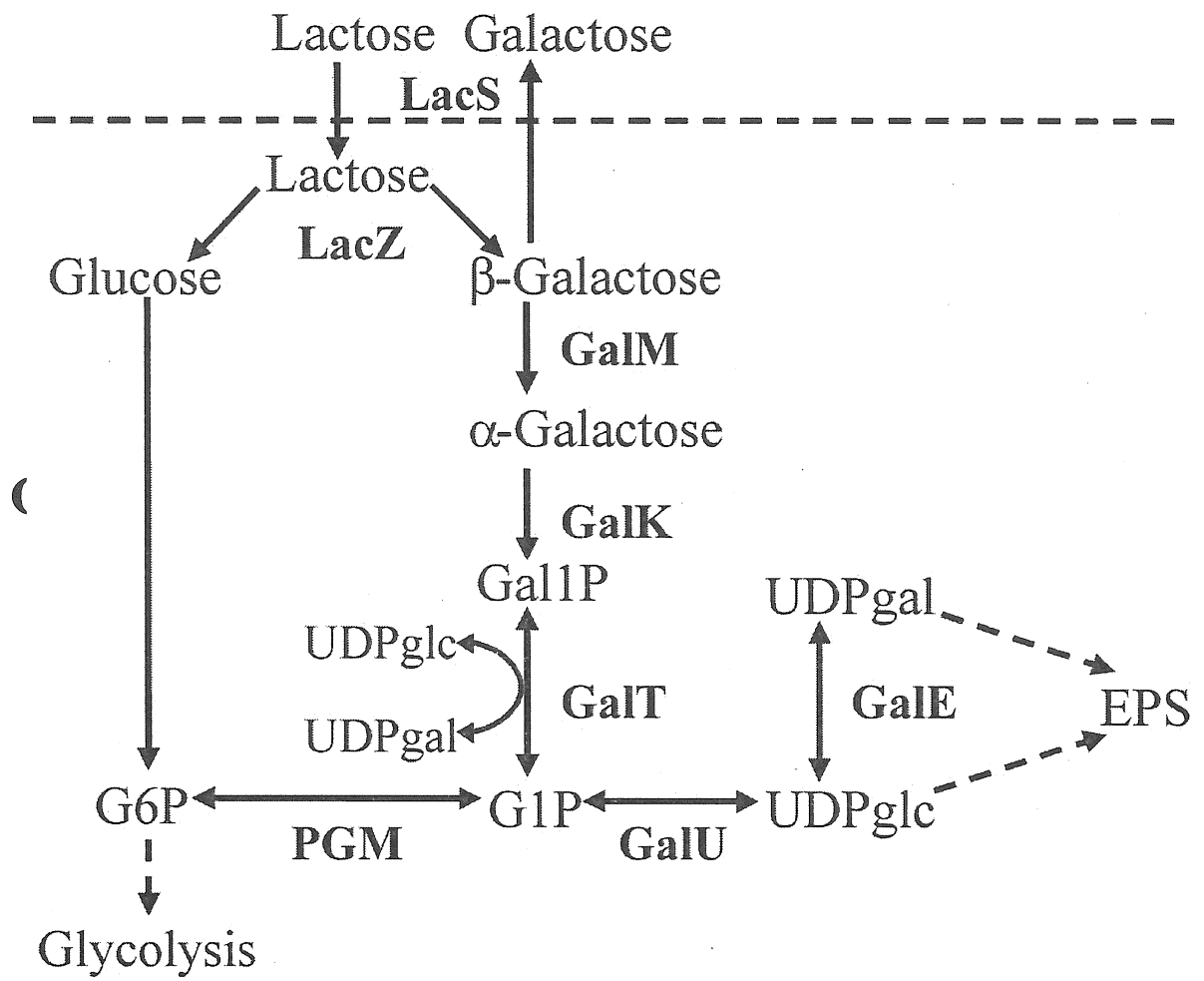


Fig. 1

```

MetSerLysLys LeuLeuGly IleAspLeu GlyGlyThrThr VallysPhe GlyIleLeu ThrAlaAspGly GluValGln
GluLysTrp AlaIleGluThr·
-----
1  ATGAGTAAGA AACTCTTAGG TATTGACCTT GGTGGAACAA CTGTTAAGTT TGGTATTTTG ACTGCAGATG GTGAAGTTCA
AGAAAAATGG GCTATTGAAA
-----
·TasnThrPhe GluAsnGly SerHisIleVal ProAspIle ValGluSer LeuLysHisArg LeuGluLeu TyrGlyLeu
ThrAlaGluAsp PheIleGly·
-----
101 CAAATACGTT TGAAGTGGT AGCCACATTG TTCCTGACAT TGTAGAATCT TTGAAACACC GTTTGGAATT GTATGGACTT
ACTGCTGAAG ATTTTATTGG
-----
Pro
·IleGlyMet GlySerProGly AlaValAsp ArgGluAsn LysThrValThr GlyAlaPhe AsnLeuAsn TrpAlaGluThr
GlnGluVal GlySerVal
-----
201 AATTGGTATG GGATCTCCAG GTGCAGTTGA CCGAGAAAAT AAAACAGTAA CGGGTGCCTT TAACTTGAAC TGGGCAGAAA
CHCC15887CAAGAAGT TGGCTCTGTT
C
-----
IleGluLysGlu LeuGlyIle ProPheAla IleAspAsnAsp AlaAsnVal AlaAlaLeu GlyGluArgTrp ValGlyAla
GlyAlaAsn AsnArgAsnVal·
-----
301 ATTGAAAAG AACTTGGTAT TCCATTGCTT ATTGATAATG ATGCTAATGT GGCTGCACTG GGTGAACGTT GGGTTGGTGC
TGGTGCTAAC AATCGGAATG
-----
Ile
·VValPheIle ThrLeuGly ThrGlyValGly GlyGlyVal IleAlaAsp GlyAsnLeuIle HisGlyVal AlaGlyAla
GlyGlyGluIle GlyHisIle·
-----
401 TTGTCTTTAT AACATTGGGT ACAGGTGTTG GTGGCGGTGT TATCGCTGAT GGTAACCTAA TTCATGGTGT TGCCGGTGCT
CHCC15757GTGGGGAAA TTGGTCACAT
T
-----
·IleValGlu ProAspThrGly PheGluCys ThrCysGly AsnLysGlyCys LeuGluThr ValAlaSer AlaThrGlyIle
ValArgVal AlaHisHis
-----
501 TATTGTTGAA CCTGACACAG GATTTGAGTG TACTTGCGGA AACAGGGGT GTCTGGAAAC TGTAGCTTCA GCAACAGGTA
TTGTACGTGT AGCACATCAT
-----
LeuAlaGluLys TyrGluGly AsnSerSer IleLysAlaAla ValAspAsn GlyGluPhe ValThrSerLys AspIleIle
ValAlaAla ThrGluGlyAsp·
-----
601 TTGGCAGAAA AATACGAAGG AAACCTCTCT ATTAAGCTG CTGTAGACAA TGGTGAAGTT GTGACAAGTA AAGATATTAT
CGTAGCTGCT ACTGAAGGTG
-----
·ALysPheAla AspSerIle ValAspLysVal SerLysTyr LeuGlyLeu AlaThrAlaAsn IleSerAsn IleLeuAsn
ProAspSerVal ValIleGly·
-----
701 ATAAGTTTGC TGACAGCATT GTTGATAAAG TCTCTAAATA CCTCGGACTT GCAACAGCAA ACATCTCAAA CATTCTTAAC
CCAGATTCTG TCGTTATCGG
-----
·GlyGlyVal SerAlaAlaGly GluPheLeu ArgSerArg ValGluGlyTyr PheThrArg TyrAlaPhe ProGlnValArg
ArgThrThr LysValLys
-----
801 TGGTGGTGT TCTGCCGAG GAGAATTCTT GCGTAGTCGT GTTGAAGGAT ACTTTACACG TTATGCATTC CCACAAGTTC
GCCGTACAAC AAAAGTGAAA
-----
LeuAlaGluLeu GlyAsnAsp AlaGlyIle IleGlyAlaAla SerLeuAla TyrSerIle AspLys*
(SEQ ID NO. 2)
-----
901 TTAGCGGAGC TTGGAATGA TGCAGGAATC ATTGGAGCTG CTAGTCTTGC TTATAGTATT GACAAATAA
(SEQ ID NO. 1)

```

Fig. 2

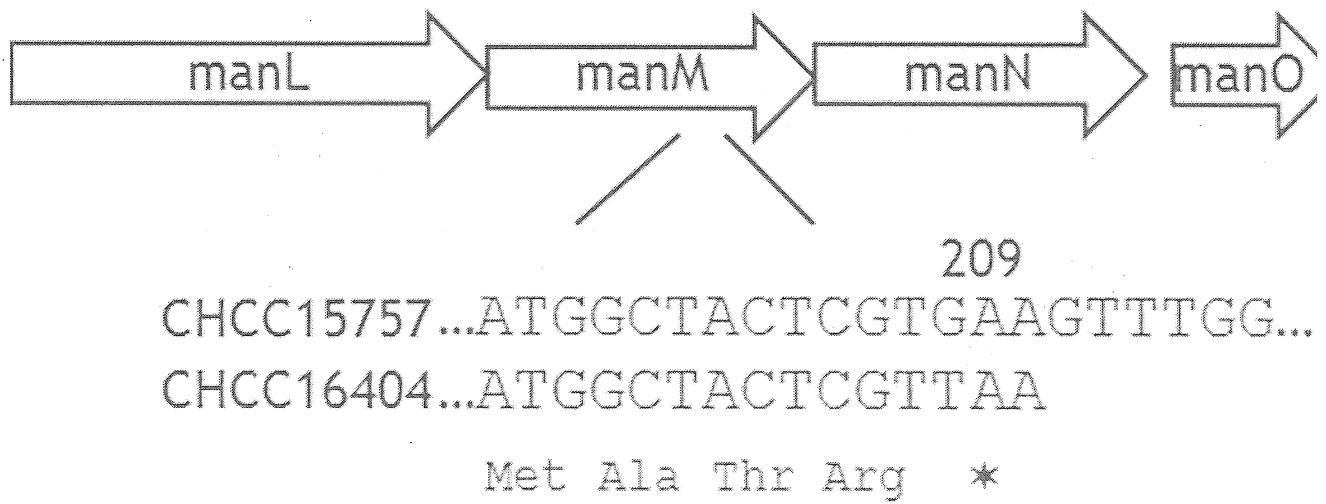


Fig. 3

4/4

```

      M S D M S I I S A I L V V A V A F L A G
      ~~~~~
1  ATGTCAGATA TGTCAATTAT TTCTGCGATT TTGGTCGTAG CTGTTGCCTT CCTTGCTGGT
   L E S I L D Q F Q F H Q P L V A C T L I
   ~~~~~
61  CTTGAAAGTA TCCTTGACCA ATTCCAATTC CACCAACCAC TTGTTGCATG TACCCTCATC
   G A A T G N L T A G I M L G G S L Q M I
   ~~~~~
121 GGTGCTGCCA CAGGTAACCT CACTGCAGGT ATCATGCTTG GTGGTTCTCT TCAAATGATT
   T L A W A N I G A A V A P D V A L A S V
   ~~~~~
181 ACCCTTGCTT GGGCAAACAT CGGTGCTGCC GTAGCTCCTG ACGTTGCCCT TGCATCTGTT
   A A A I I L V K G G K F T A E G I G V A
   ~~~~~
241 GCCGCTGCCA TCATTTTGGT TAAAGGTGGT AAATTACAG CTGAAGGTAT CGGTGTTGCG
   I A I A I L L A V A G L F L T M P V R T
   ~~~~~
301 ATTGCAATAG CTATCCTGCT TGCAGTTGCA GGTCTCTTCC TAACTATGCC TGTTCGTACA
   A S I A F V H A A D K A A E H G N I A G
   ~~~~~
361 GCATCTATTG CCTTTGTTCA TGCTGCAGAT AAAGCTGCAG AACACGGAAA CATCGCTGGT
   ~~~~~
   V E R A Y Y L A L L L Q G L R I A V P A
   ~~~~~
421 GTTGAACGTG CATACTACCT CGCTCTCCTT CTTCAAGGTT TGCGTATTGC TGTGCCAGCA
   A L L L A I P A Q S V Q H A L G L M P D
   ~~~~~
481 GCCCTTCTTC TTGCCATCCC GGCCCAATCT GTTCAACATG CCCTTGCTT GATGCCTGAC
   W L T H G L V V G G G M V V A V G Y A M
   ~~~~~
541 TGGCTCACCC ATGGTTTGGT TGTCGGTGGT GGTATGGTCG TAGCCGTTGG TTACGCCATG
   I I N M M A T R E V W P F F A I G F A L
   ~~~~~
601 ATTATCAATA TGATGGCTAC TCGTGAAGTT TGGCCATTCT TCGCCATTGG TTTTGCTTTG
CHCC16404 T
      A A I S Q L T L I A L S T I G V A I A F
      ~~~~~
661 GCAGCAATTA GCCAATTGAC ACTTATCGCT CTTAGTACCA TTGGTGTGTC CATCGCCTTC
   I Y L N L S K Q G G G N G G G N G G G T
   ~~~~~
721 ATCTACCTCA ACCTTTCTAA ACAAGGTGGC GGAAATGGTG GCGGAAATGG TGGCGGAACT
   S S G S G D P I G D I L E D Y (SEQ ID NO.6)
   ~~~~~
781 TCATCTGGTT CAGGCGACCC AATCGGCGAT ATCTTGAAG ACTAC (SEQ ID NO.5)

```

Fig. 4